

10/532 986  
Rec'd JPT/PTO 28 APR 2005  
PCT/JP03/13851

(#2)

29.10.03

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2002年10月29日

出願番号  
Application Number: 特願2002-314078  
[ST. 10/C]: [JP 2002-314078]

RECEIVED	
19 DEC 2003	
WIPO	PCT

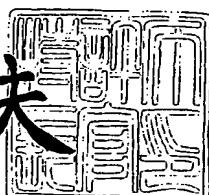
出願人  
Applicant(s): 近藤 玄

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年12月 4日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2003-3100140

【書類名】 特許願  
【整理番号】 NP02405-YS  
【提出日】 平成14年10月29日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 A61K 38/17  
【発明の名称】 アンギオテンシン変換酵素含有薬剤  
【請求項の数】 3  
【発明者】  
【住所又は居所】 京都府京都市左京区岡崎北御所町18番地  
【氏名】 近藤 玄  
【特許出願人】  
【住所又は居所】 京都府京都市左京区岡崎北御所町18番地  
【氏名又は名称】 近藤 玄  
【代理人】  
【識別番号】 100093230  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 西澤 利夫  
【電話番号】 03-5454-7191  
【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 009911  
【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1  
【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 アンギオテンシン変換酵素含有薬剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 アンギオテンシン変換酵素を含有し、GPIアンカー型タンパク質を細胞膜から遊離させることを作用機序とするアンギオテンシン変換酵素含有薬剤。

【請求項 2】 プリオン性疾患の予防または治療用である請求項 1 の薬剤。

【請求項 3】 細菌感染疾患の予防または治療用である請求項 1 の薬剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この出願の発明は、アンギオテンシン変換酵素を含有する薬剤に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、GPIアンカー型タンパク質を細胞膜から遊離させることを作用機序とし、プリオン性疾患や細菌感染疾患等の予防または治療に有用な薬剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

アンギオテンシン変換酵素 [angiotensin-converting enzyme : ACE。酵素学的にはジペプトイジルカルボキシペプチダーゼ (EC 3.4.15.1) ] は、レニン・アンギオテンシン・アルドステロン血圧制御系の一員で、アンギオテンシン I を活性化型のアンギオテンシンIIに変換するとともに、プラティキニンを分解不活性化することによって様々な生理活性の変化 (例えば、血圧上昇) を生じさせることが知られている (非特許文献 1)。このため、ACE阻害を薬理作用とする薬剤 (例えば、血圧降下剤) やACE阻害剤等の発明が数多く存在する (例えば、特許文献 1-4)。

【0003】

一方、細胞の表面を構成する細胞膜はタンパク質と脂質を主成分とし、エネルギーの生産、刺激の伝達、細胞間相互作用、分泌などの多彩な生命機能を営む場である。GPIアンカー型タンパク質はGPIアンカーを介して細胞膜に結合するその

主要な構成成分であり、上記の生命機能維持の一翼を担っている重要な分子群である。しかし他方で、細胞膜のGPIアンカーには正常型プリオントンタンパク質が結合しており、この正常型プリオントンに異常型プリオントンが結合するとクロイツフェルト・ヤコブ病、Grestmann-Straussele症候群、クルー病等のいわゆる「プリオントン性疾患」の原因となる。また、GPIアンカーに結合するリポポリサッカライド(LPS)受容体CD14には菌体毒素LPSが結合し、細胞障害の原因となっている。

#### 【0004】

従って、プリオントン性疾患や細菌感染等に対する症状の緩和や治療においては、GPIアンカー型タンパク質を細胞膜から遊離させることが有効である。しかしながら、細胞表面における有効なGPIアンカー型タンパク質遊離活性物質はこれまで知られていなかった。

#### 【0005】

なお、ACEはアンギオテンシンⅠおよびブラディキニン以外の基質、例えばエンケファリン、ならびにヘプタペプチドおよびオクタペプチドのエンケファリン前駆体を切断する。また、トリデカペプチド、ニューロテンシンをジペプチドおよびウンデカペプチドに加水分解し、さらにはサブスタンスPを切断不活性化することが知られている（非特許文献2）。しかしながら、ACEがGPIアンカー型タンパク質を細胞表面からGPIアンカータンパク質から切断遊離することは、従来、全く知られていない。

#### 【0006】

##### 【特許文献1】

特開平10-036391号公報

##### 【特許文献2】

特開2001-064299号公報

##### 【特許文献3】

特開2001-233789号公報

##### 【特許文献4】

特開2002-138100号公報

##### 【非特許文献1】

Hooper et al., Int. J. Biochem. 23:641-647, 1991

【非特許文献2】

Skidgel et al., Neuropeptides and Their Prptidases, Turner AJ Ed.,  
Chichester, UK, 1989

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

この出願の発明者は、GPIアンカー型タンパク質遊離活性を有する物質を探索し、この物質がACEであることを見出した。

【0008】

この発明は、発明者による以上のとおりの新規な知見に基づくものであり、有害なGPIアンカー型タンパク質を細胞膜から遊離させることによって各種疾患を予防または治療するための新規薬剤を提供することを課題としている。

【0009】

【課題を解決するための手段】

この出願は、前記の課題を解決するための発明として、アンギオテンシン変換酵素を含有し、GPIアンカー型タンパク質を細胞膜から遊離させることを作用機序とするアンギオテンシン変換酵素含有薬剤を提供する。

【0010】

この薬剤は、好ましくは、プリオントン性疾患または細菌感染疾患の予防または治療用としての薬剤である。

【0011】

この発明において、「GPIアンカー型タンパク質」とは、細胞膜のGPIアンカーに結合するタンパク質であり、例えば、プリオントン性疾患に関係する正常型または異常型プリオントン、菌体毒素LPSの受容体CD14等である。

【0012】

「GPIアンカー型タンパク質を細胞膜から遊離させる」とは、細胞膜のGPIアンカーに結合しているGPIアンカー型タンパク質をGPIアンカーから切断分離させて、不活性化させることを意味する。これによって、例えばGPIアンカー型タンパク質である正常型プリオントンが細胞膜から遊離され、正常型プリオントンに結合してブ

リオン性疾患の原因となる異常型プリオンが細胞膜に結合することが防止される。また、菌体毒素LPSの受容体CD14が細胞膜から遊離されるため、膜型CD14-LPS複合体の形成が阻害され、LPSによる細胞障害や炎症反応の拡大が防止または改善される。

#### 【0013】

「プリオン性疾患」は、例えば、クロイツフェルト・ヤコブ病、Grestmann-St raussele症候群、クルー病等である。

#### 【0014】

「細菌感染疾患」は、例えば、グラム陰性菌（大腸菌、インフルエンザ桿菌、サルモネラ菌、髓膜炎菌、綠膿菌等）による感染症であり、またそれらの細胞毒によるエンドトキシンショック等の炎症性疾患等である。

#### 【0015】

なお、この発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能である。例えば、薬剤の調製はRemington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990、遺伝子工学および分子生物学的技術はSambrook and Maniatis, in Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989; Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y, 1995) 等に記載されている。

#### 【0016】

以下、発明の実施形態を詳しく説明する。

#### 【0017】

##### 【発明の実施の形態】

この発明において使用するACEは、ヒトをはじめとする各種哺乳動物の細胞（体細胞や精巣細胞）から公知の方法によって単離することができる（体細胞型ACE-S、精巣型ACE-T）。また、市販品（例えば、ウサギ肺由来のACE-S：Sigma A-6778等）や、特表2002-525108号公報に開示されているアンギオテンシン変換酵素相同物を使用することもできる。さらには、そのアミノ酸配列（ヒトACE-S：Gen

Bank/J04144、ヒトACE-T:GenBank/M26657)等に基づいて公知の固相ペプチド合成法により化学合成して作製することもできる。あるいは、ACEをコードするポリヌクレオチドをin vitro転写翻訳系や適当な宿主-ベクター系で発現させることによって、組換えACEとして取得することができる。ポリヌクレオチド(例えばACE cDNA)は前記GenBankデータベースや特表2002-525108号公報の塩基配列情報に基づき作製したオリゴヌクレオチドプローブを用いて既存のcDNAライブラリーをスクリーニングする方法や、オリゴヌクレオチドプライマーを用いたRT-PCR法等の公知の方法により取得することができる。

#### 【0018】

例えば組換えACEをin vitro転写翻訳で作製する場合には、前記ポリヌクレオチドを、RNAポリメラーゼプロモーターを有するベクターに挿入して発現ベクターを作製し、このベクターを、プロモーターに対応するRNAポリメラーゼを含むウサギ網状赤血球溶解物や小麦胚芽抽出物などのインビトロ翻訳系に添加する。RNAポリメラーゼプロモーターとしては、T7、T3、SP6などが例示できる。これらのRNAポリメラーゼプロモーターを含むベクターとしては、pKAl、pCDM8、pT3/T7 18、pT7/3 19、pBluescript IIなどが例示できる。

#### 【0019】

組換えACEを、大腸菌などの微生物で発現させる場合には、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、DNAクローニング部位、ターミネーター等を有する発現ベクターに前記のDNA断片を組換えた発現ベクターを作成し、培養物から融合ペプチドを単離する。大腸菌用発現ベクターとしては、pUC系、pBluescript II、pET発現システム、pGEX発現システムなどが例示できる。

#### 【0020】

また組換えACEを真核細胞で発現させる場合には、前記の融合ポリヌクレオチドを、プロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する真核細胞用発現ベクターに挿入して組換えベクターを作成し、真核細胞内に導入すれば、融合ペプチドを形質転換真核細胞で発現させることができる。発現ベクターとしては、pKAl、pCDM8、pSVK3、pMSG、pSVL、pBK-CMV、pBK-RSV、EBVベクター、p

RS、pcDNA3、pMSG、pYES2などが例示できる。真核細胞としては、サル腎臓細胞COS7、チャイニーズハムスター卵巣細胞CHOなどの哺乳動物培養細胞、出芽酵母、分裂酵母、カイコ細胞、アフリカツメガエル卵細胞などが一般に用いられるが、目的とするタンパク質を発現できるものであれば、いかなる真核細胞でもよい。

#### 【0021】

発現ベクターを宿主細胞に導入するには、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法など公知の方法を用いることができる。

#### 【0022】

融合ペプチドを原核細胞や真核細胞で発現させたのち、培養物から組換えACEを単離精製するためには、公知の分離操作を組み合わせて行うことができる。例えば、尿素などの変性剤や界面活性剤による処理、超音波処理、酵素消化、塩析や溶媒沈殿法、透析、遠心分離、限外濾過、ゲル濾過、SDS-PAGE、等電点電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーなどが挙げられる。

#### 【0023】

この発明の薬剤は、実施的にACE単独であってもよいが、疾患の種類や薬剤の投与形態に応じて、薬剤的に許容される担体と混合して調製することが好ましい。すなわち、この発明の薬剤は、非経口的または経口的な投与に適した剤型となるような担体と混合することができる。

#### 【0024】

非経口投与は、局所注入、腹腔内投与、選択的静脈内注入、静脈注射、皮下注射、臓器灌流液注、直腸投与等であり、例えば注射剤としての製剤化する場合の担体としては、滅菌水、塩溶液、グルコース溶液、または塩水とグルコース溶液の混合物等を使用することができる。また緩衝剤pH調節剤（リン酸水素ナトリウム、クエン酸等）、等張化剤（塩化ナトリウム、グルコース等）、保存剤（パラオキシ安息香酸メチル、P-ヒドロキシ安息香酸プロピル等）等の製薬補助剤を含有することもできる。このように製剤化した薬剤は、細菌保持フィルターを通す濾過、組成物への殺菌剤の混入、組成物の照射や加熱によって滅菌することができる。また粉末状態で製剤化し、使用時に前記液体担体と混合して注射液を調

製するようにしてもよい。

#### 【0025】

経口投与剤は胃腸器官による吸収に適した剤形（例えば、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、粉末剤、または懸濁剤やシロップ剤のような経口液体調製物等）に製剤化する。担体としては、常用の製薬補助剤、例えば結合剤（シロップ、アラビアゴム、ゼラチン、ソルビット、トラガカント、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルセルロース等）、賦形剤（ラクトース、シュガー、コーンスターチ、リン酸カルシウム、ソルビット、グリシン等）、滑沢剤（ステアリン酸マグネシウム、タルク、ポリエチレングリコール、シリカ等）、崩壊剤（ポテトスターチ、カルボキシメチルセルロース等）、潤滑剤（ラウリル硫酸ナトリウム等）を使用することができる。ストロベリー・フレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加することもできる。また錠剤は常法によりコーティングすることができる。経口液剤は水溶液またはドライプロダクトにすることができる。そのような経口液剤は常用の添加剤、例えば保存剤（p-ヒドロキシ安息香酸メチルもしくはプロピル、ソルビン酸等）を包含していくてもよい。

#### 【0026】

ACEの含有量は対象疾患やその投与形態に応じて適宜とすることができるが、通常は5~100% (w/w)、好ましくは10~60% (w/w)の範囲とすることができる。

#### 【0027】

この発明の薬剤の投与量は、患者の年齢や体重、症状、投与経路等によって異なるが、ACE量として100~200mg/kg/day程度とすることができる。なお、ACEは人体に存在するタンパク質であり、その安全性については問題がない。

#### 【0028】

以下、ACEのGPIアンカー型タンパク質遊離活性について試験した結果について説明する。

##### 1. 材料と方法

###### 1.1. 組織学的分析

GPIアンカーGFP (EGFP-GPI) 遺伝子導入マウス (Kondoh, G. et al. FEBS let t. 458, 299-303, 1999) をフェノバルビタールにより麻酔し、左心室経由で4% (

W/V) パラホルムアルデヒド-PBSを灌流させることにより固定した。切除した組織を4%パラホルムアルデヒド-PBS中で再度固定し、20%スクロース-PBS中で4°Cで48時間にわたりインキュベートした。次に組織断片をTissue-Tek O.C.T.化合物 (Sakura Finetek, Torrance, CA) 中に埋め込み、ドライアイスで急速冷凍し、低温槽上で5-10 μm厚に切断した。標本の調査は、GFP特異的フィルタを用いた蛍光顕微鏡 (Olympus, Tokyo) を用いて行った。

### 1.2. EGFP-GPIのイムノプロッティング

Complete TMプロテアーゼ阻害剤 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) 存在下、氷冷状態のTNE溶液 (10mM Tris-HCl pH7.8、1mM EDTA、150mM NaCl) 中で細胞と組織をホモジナイズした。ホモジネートは100,000×gで遠心分離し、上清を収集した（水溶性分画）。沈殿はTNE緩衝液中で洗浄し、次に1% TritonX-114 (Nacalai tasque, Kyoto, Japan) -TNE溶液中、Complete TMプロテアーゼ阻害剤の存在下でホモジナイズを行い、100,000×gで遠心分離し、上清を収集した（界面活性剤可溶性分画）。各組織の両方の分画をSDS-PAGEに供し、ニトロセルロース膜に電気泳動的に転写し、抗GFPウサギポリクローナル抗体 (MBL, Nagoya, Japan) によるプローブ処理を行い、抗ウサギIgGを結合したECLシステム (Amersham Bioscience, Piscataway, USA) を用いて染色の検出を行った。

### 1.3. PLAP変換アッセイ

非イオン化界面活性剤のTritonX-114が、37°Cの条件で水溶性分子と界面活性剤可溶性の疎水性分子を分配する性質を利用した。PLAP変換アッセイを用いて、精製途中におけるGPIアンカータンパク質遊離活性のモニタリングを行った。PLAPは、COS7細胞中でcDNAを発現させて緩衝液 (20mM Tris pH8.0、150mM NaCl、1% TritonX-114、Complete TMプロテアーゼ阻害剤) により抽出することにより調製し、37°Cで分配した後で界面活性剤可溶性の相を収集した。次にDEAE-セルロース陰イオン交換液体クロマトグラフィー (LC) によりPLAPを部分精製した。界面活性剤可溶性のPLAPタンパク質を基質に用いてアッセイを行った。リン脂質部分を切断した場合には、PLAPはTritonX-114分画に界面活性剤可溶性の相から水溶性の相に移動し、PLAPの酵素活性は水溶相中で検出可能である。PLAP活性の測定は、アルカリホスファターゼ検出キット (Nacalai tasque, Kyoto) を用いて

製造元のプロトコルに従って行った。変換反応は、100mM Tris pH7.5、5mM CaCl<sub>2</sub>、150mM NaClおよび0.1UのPLAPの条件で、90分にわたり37℃で実施した。反応停止はTritonX-114を最終濃度2%となるように添加することで行い、試料を25℃で微小遠心分離した。水溶相を収集し、PLAP活性を測定した。またこれはポリクローナル抗-PLAP抗体を用いたイムノプロッティングにも用いた(Biomedica, Foster City, USA)。

#### 1.4. GPIアンカータンパク質遊離活性物質の精製

成熟したICRマウスの精巣500個を莢から出し、カミソリを用いて~1mm<sup>3</sup>の断片に切断した。生殖細胞の単離はピペット吸引の反復により行った。軽い遠心により輸精管を除去した後、上清を収集し、1500×gで遠心分離することによりさらに沈降させた。沈殿は10倍量の緩衝液(3mM Tris pH7.4、2mM MgCl<sub>2</sub>、1mM EDTA、0.25Mスクロース、およびComplete TM プロテアーゼ阻害剤を含む)中で破碎および超音波処理を行い、ホモジネートを100,000×gで1時間にわたり遠心分離した。その沈殿を10倍量の緩衝液(20mM Tris pH8.0、1% TritonX-100、およびComplete TM プロテアーゼ阻害剤を含む)中で可溶化した。溶解産物は超遠心(100,000×g)で1時間にわたり分離を行い、上清を収集した。この試料を以下の連続液体クロマトグラフィーにより精製した。

- (1) DEAE-セルロース (Seikagakukogyo, Tokyo) ; 緩衝液(20mM Tris pH8.0、0.1% TritonX-100、0mM~500mM NaCl勾配)で溶出。
- (2) フェニルセファロース-セルロースCL-4B (Amersham Bioscience, Piscataway, USA) : 緩衝液(20mM Tris pH7.5、0.1% TritonX-100)で溶出。
- (3) ConA-セファロース4B (Amersham Bioscience, Piscataway, USA) ; 緩衝液(20mM Tris pH7.5、0.1% TritonX-100、150mM NaCl、500mM methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (Seikagakukogyo, Tokyo))で溶出。
- (4) TSKゲル3000SW (Tosoh, Tokyo) ; 緩衝液(20mM Tris pH7.5、0.1% TritonX-100、300mM NaCl)で溶出。

#### 1.5. プロテオミクス分析

精製ペプチドをSDS-PAGEにより分離し、リシリエンドペプチダーゼを用いて消化し、Q-Tof2 LC-MS/MS (Micromass, UK)に供した。得られたシグナルに対して

Mascot検索を行った。

#### 1.6. 細胞培養とトランスフェクション

F9、HeLaおよびCOS7細胞を、10% FCSを加えたDMEM培地で培養した。DNAトランスフェクションにはリポフェクトアミン試薬（Life Technologies, Rockville, USA）を製造元のプロトコルに従って使用した。

#### 1.7. ACE試料

ACE cDNAを、マウス精巣cDNAをテンプレートとして、'5-TGAATTCCACCATGGGCCAAGGTTGGGCTACTCCAGG-3'（配列番号1）および'5-GAATTCTGTCACCTATCATCATCATCCTTATAATCCTGCTGTGGCTCCAGGTACAGGC-3'（配列番号2）のプライマーセットを用いてRT-PCRにより調製した。このPCR産物は、FLAGを付加した可溶性精巣ACEのアイソフォームをコードしている。このACE cDNAをトランスフェクションしたCOS7細胞の培養上清を収集し、組換えACEを抗-FLAG M2-アガロースアフィニティカラム（Sigma, St. Louis）を用いて精製した。また、ウサギ肺由来ACEの体細胞アイソフォーム（ACE-S）（Sigma A-6778）と、製造業者の支持する活性単位を使用した。

#### 1.8. FACS分析

0.02% EDTA/PBSを用いて細胞を培養皿から剥離させ、1% BSAを含むHank's調整塩溶液に数回浸した。懸濁した細胞を、適切な時点で10 μg/mlのフィリピン（filipin）/PBS（Sigma, St. Louis）を用いて0°Cで1時間にわたり処理した。PBSに浸した後、細胞をPBS稀釀化ACEまたはPI-PLC（GLYKO, Novato, USA）と共に、カプトプリル（Sigma, St. Louis）の存在下または非存在下の条件で、37°Cで1時間にわたり処理を行った。次に細胞を1% BSAを含むPBSに繰り返し浸し、ヒトCD59、ヒトDAF、マウスSca-1、マウスThy1.2、あるいはマウスE-カドヘリンに対するビオチン共役抗体を用いて染色し、次にフィコエリトリン共役ストレプトアビジン（Pharmingen-Fujisawa, Tokyo）を用いて染色した。

#### 【0029】

また、プリオントンパク質（PrP）の遊離活性は、ヒト胎児由来線維芽細胞（HEK293細胞）および抗ヒトプリオントンモノクローナル抗体3F4（Signet Laboratories, USA）を使用し、前記と同様に染色した。

## 【0030】

染色した細胞をFACScanセルソーターに供した。ソートされた細胞の生存度を、FSCおよびSSCチャンネルにより評価した。F9細胞内で発現したEGFP-GPIは直接検出した。各試料の平均吸光度は、ACE(-)の試料を1.0として評価した。切断放出%は、図6の説明に示す方法で計算した。分析は少なくとも4回行い、事実上同一の結果が得られた。

1.9.

## 2.結果と考察

### 2.1. 遺伝子導入マウスとそのGPIタンパク質

図1は、EGFP-GPI遺伝子導入マウスの精巣の蛍光シグナルを撮影した写真像である。生殖細胞 (Gc) におけるEGFP-GPIの発現は第2系統 (Line 2) に見られたが、第1 (示さず) および第3系統には見られなかった。

## 【0031】

図2は、遺伝子導入動物の精巣におけるEGFP-GPIタンパク質の溶解度を解析した結果である。界面活性剤を添加した溶解緩衝液 (Tx-114+) または界面活性剤非添加の溶解緩衝液 (Tx-114-) を用いて組織を可溶化し、溶解産物の一部をウエスタンプロッティングに供した。EGFP-GPIが界面活性剤非存在下で積極的に可溶化したのは、第2系統の精巣においてのみであった。水溶性タンパク質の大きさ (Ln. 2, Tx-114-) が界面活性剤可溶性の膜アンカータンパク質 (Ln. 2, Tx-114+) と同等であった点は特記すべきである。

### 2.2. GPIアンカータンパク質放出因子の特定

EGFP-GPI遺伝子導入マウスを用いて、GPIアンカー膜結合型タンパク質放出因子の同定を行い、目的の活性を有する100kDaタンパク質を精製した。すなわち、マウス精巣に由来する生殖細胞の膜リッチ分画を1% Triton X-100を含む緩衝液中で可溶化し、遠心分離を行って上清を取り、クロマトグラフィーによる分画に供した。溶出分画に対してPLAP変換アッセイを行い、その最大値を表1に示す。なお、全ての反応はPI-PLC (1.0U/ml) 処理を付随して行い、その値を最大反応として定義した。図3は、銀染色によるこの100kDaタンパク質の単一バンドを示す。

## 【0032】

【表1】

カラム	容積	総タンパク質	総活性	比活性	精製率
S-100 sup.	393ml	19100mg	336160 単位 (U*)	18U/mg タンパク質	1.0
DEAE- セルロース	8	228	14410	63	3.5
フェニル セファロース	8	212	17596	83	4.6
Con-A- セファロース	1	6	6100	1017	56.5
TSK gel 3000SW	1	1	2500	2500	138.9

\*Unit=試料の計数値-背景の計数値/PI-PLCの計数値-背景の計数値

この精製タンパク質は、プロテオミクス分析によりACEであることを確認した

。

## 【0033】

さらにこの精製タンパク質活性を、組換えACEおよび市販品ACEと比較した。すなわち、組換えタンパク質および市販品ACEはPLAPを水溶性形態に変換するかを確かめるため、部分精製したPLAPを、精製組換えACE (rACE) または市販製品 (ACE-S) と反応させた。TritonX-114による分配後、水溶性相の一部をSDS-PAGEに供し、PLAPを免疫プロッティングにより検出した。結果は図4に示した通りである。可溶性PLAPに相当するバンドはPI-PLC処理を行った試料よりわずかに小さいが、rACEおよびACE-S処理サンプルの両方に見ることができる。

## 【0034】

また、ACE反応の用量依存性を。部分精製したPLAPを様々な濃度のACE-Sと反応させ、水溶相のPLAP活性を測定した。結果は図5に示したとおりである。この図5に示したとおり、市販品ACEにおいてもその活性は用量依存的であり、しかもこの活性は特異的なACE阻害剤であるカプトプリルによって阻害された。

## 2.3. GPIアンカー型タンパク質に対するACEの作用

ACEを用いて生細胞を直接処理し、FACSを用いて細胞表面の各種GPIアンカー型タンパク質の状態を調査した。まずCD59および解離促進因子 (DAF) の2種類のGPIアンカー型タンパク質のHeLa細胞上における発現を分析した。すなわち、HeLa

細胞をフィリピン前処理（右）または非処理（左）で、1.0U/mlのACE-Sまたは2.8U/mlのPI-PLCを用いて処理し、細胞表面のCD59とDAFの発現をFACS分析により調査した。結果は図6（左）に示したとおりであり、両タンパク質の表面発現は減少した。この結果から、ACE処理された細胞ではGPIアンカー型タンパク質であるCD59およびDAFが細胞膜上から切断放出されることが確認された。さらに、この切断放出（shedding）活性は、コレステロールブロッキング剤であるフィリピン（filipin）を用いて膜脂質ラフトを分裂させた場合により明確化し（図6右）、用量依存的であり（図7）、またカプトプリルによる阻害された（図8）。

#### 【0035】

さらに、他のGPIアンカータンパク質に対するACEの活性をF9細胞において解析した。すなわち、フィリピン前処理（右）または非処理（左）条件下で、EGFP-GPIをトランスフェクションしたF9細胞を1.0U/mlのACE-Sにより処理し、EGFP-GPI、Sca-1、Thy-1およびE-カドヘリンの細胞表面発現をFACS分析により調べた。結果は図9に示したとおりである。フィリピン処理後にはGPIアンカータンパク質の発現は減少していたが、膜貫通型E-カドヘリンは減少しなかった。以上の結果から、EGFP-GPI、Sca-1、Thy-1等のGPIアンカータンパク質も、細胞のACE処理によって同様に切断放出されることが確認された。

#### 【0036】

さらに、ACE-Sによるプリオントンパク質の遊離活性は、図10、11に示したとおりである。HEK293細胞に結合したプリオントンパク質は、ACE-S（1.0U/ml）を処理することによって、平均37%が細胞膜から遊離することが確認された。

#### 【0037】

##### 【発明の効果】

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、GPIアンカー型タンパク質を細胞膜から遊離させることによって、プリオントンパク質、炎症性疾患、細菌感染性疾患等を効果的に予防または治療することができる薬剤が提供される。

#### 【0038】

##### 【配列表】

<110> Kondoh, Gen

<120> ACE containing drug

<130> NP02405-YS

<160> 2

<210> 1

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 1

TGAATTCCAC CATGGGCCAA GGTTGGGCTA CTCCAGG

37

<210> 2

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 2

GAATTCTGCA CTTATCATCA TCATCCTTAT AATCCTGCTG TGGCTCCAGG TACAGGC

57

**【図面の簡単な説明】****【図 1】**

EGFP-GPI遺伝子導入マウスの精巣における蛍光局在化を観察した顕微鏡像である。EGFP-GPIの生殖細胞 (Gc) 発現は第2系統 (Lane 2) マウスに見られたが、第1 (示さず) および第3系統マウスには見られなかった。Lyはライディヒ細胞。倍率は200倍。

**【図 2】**

EGFP-GPI遺伝子導入マウスの精巣におけるEGFP-GPIタンパク質の溶解度を調べた電気泳動像である。界面活性剤を添加した溶解緩衝液 (Tx-114+) または界面活性剤非添加の溶解緩衝液 (Tx-114-) を用いて組織を可溶化し、溶解産物の一部をウエスタンプロット解析した。EGFP-GPIが界面活性剤非存在下で積極的に可溶化したのは、第2系統マウスの精巣においてのみであった。水溶性タンパク質の大きさ (Ln. 2, Tx-114-) が界面活性剤可溶性の膜アンカータンパク質 (Ln. 2, Tx-114+) と同等であった点は特記すべきである。F9はF9トランスフェクタント、NTgは対照としての非トランスジェニックである。

**【図 3】**

GPIアンカータンパク質遊離因子としてのACEを同定した電気泳動像であり、ACEは銀染色による100kDaの単一バンドとして検出された。

**【図 4】**

部分精製したPLAPを、精製した組換えACE (rACE) または市販製品 (ACE-S) と反応させ、TritonX-114による分配後、水溶性相の一部をSDS-PAGEに供し、PLAPを免疫プロッティングにより検出した結果である。可溶性PLAPに相当するバンドはPI-PLC処理を行った試料よりわずかに小さいが、rACEおよびACE-S処理サンプルの両方に見ることができる。Inputは反応の基質である。

**【図 5】**

ACE反応の用量依存性を測定した結果である。部分精製したPLAPを様々な濃度のACE-Sと反応させ、水溶相のPLAP活性を測定した。値は平均値±SD、n=3である。0 mU/mlを対照とした。student's t検定による有意差水準は、\* : P<0.01、\*\*

: p<0.05である。反応はカプトプリルにより阻害された（下部）。

#### 【図6】

HeLa細胞をfilipin前処理（右）または非処理（左）で、1.0U/mlのACS-Sまたは2.8U/mlのPI-PLCを用いて処理し、細胞表面のCD59およびDAFの発現をFACS分析した結果である。ACE処理によってタンパク質の発現は減少したが（細胞数の左シフト）、その程度は異なっていた（CD59は66%、filipin処理後のDAFは58%）。aはACE(-)、bはACE(+)、cはPI-PLC処理を行ったもの。各ラインの数値は中央値（Mean）である。なお、遊離%は、それぞれの細胞集団ごとの平均蛍光度を用いて次のように算出した：

$$\text{遊離\%} = \text{ACE}(-) - \text{ACE}(+) / \text{ACE}(-) - \text{PI-PLC} \times 100$$

PI-PLC処理を行った母集団の平均吸光度を最大遊離、ACE(-)の同値を遊離無しと定義した。

#### 【図7】

filipin処理を行ったHeLa細胞を様々な濃度のACE-S存在下でインキュベートし、CD59の細胞表面発現をFACS分析し、遊離%を算出した結果である。値は平均値±SD、n=3である。0 U/mlを対照とした。student's t検定による有意差水準は、\* : P<0.005、\*\* : p<0.01である。

#### 【図8】

filipin処理したHeLa細胞を、表示されたカプトプリル用量の存在下、10<sup>-7</sup> MのACEペプチドに相当する0.2U/mlのACE-Sと共にインキュベートし、CD59の細胞表面発現をFACS分析した結果である。値は平均値±SD、n=3である。カプトリル0 Mを対照とした。student's t検定による有意差水準は、\* : P<0.01、\*\* : p<0.05である。

#### 【図9】

filipin前処理（右）または非処理（左）条件下で、EGFP-GPIをトランスフェクションしたF9細胞を1.0 U/mlのACE-Sにより処理し、EGFP-GPI、Sca-1、Thy-1およびE-カドヘリンの細胞表面発現をFACS分析した結果である。filipin処理後にはGPIアンカータンパク質の発現は減少していたが、膜貫通型E-カドヘリンは減少していないことが分かり（細胞集団の左シフト）、またそれらの程度は異なる

っていた（遊離%：EGFP-GPIは53%、Sca-1は67%、Thy-1は34%）。各ラインの説明は図6と同様である。

【図10】

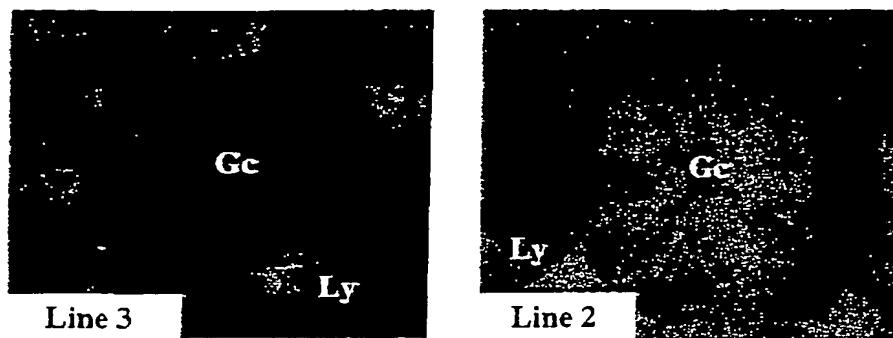
上図は、プリオントンタンパク質（PrP）を結合したHEK293細胞を1.0 U/mlのACE-Sにより処理し、プリオントンタンパク質の遊離をFACS分析した結果である。下図は、対照としてCD59の遊離を分析した結果である。

【図11】

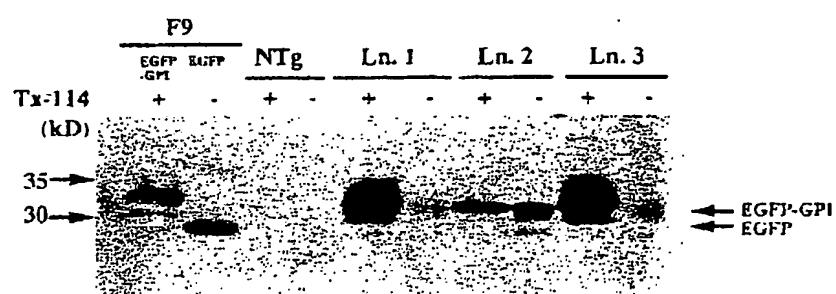
図6、図9および図10の結果を要約したグラフである。

【書類名】 図面

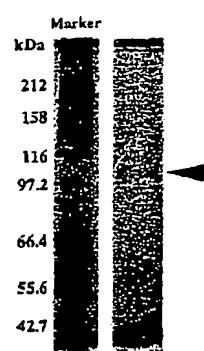
【図1】



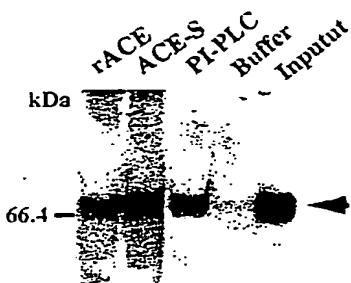
【図2】



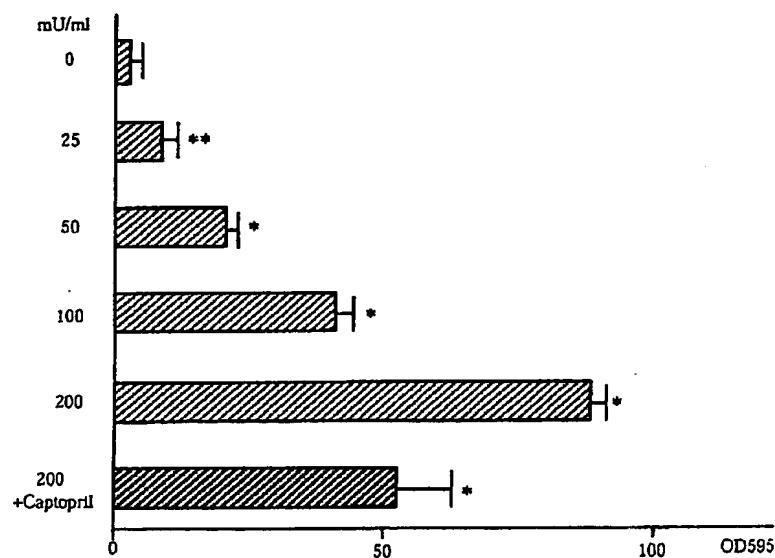
【図3】



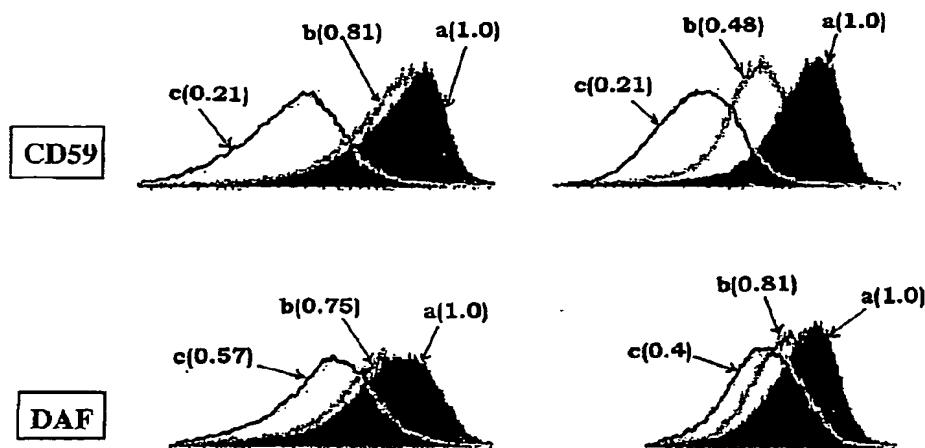
【図 4】



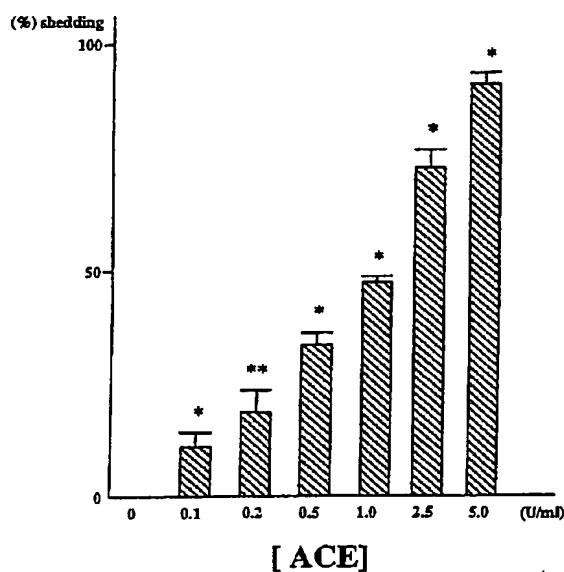
【図 5】



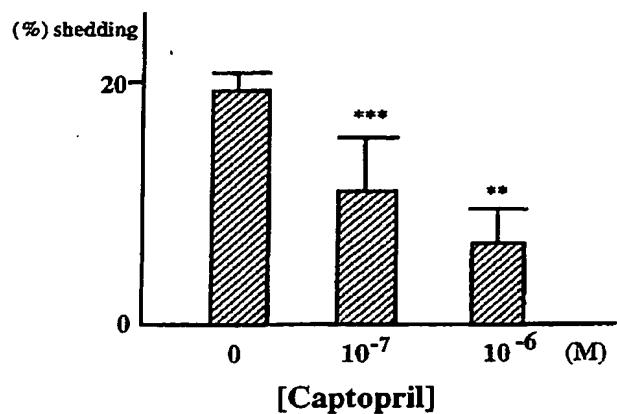
【図6】



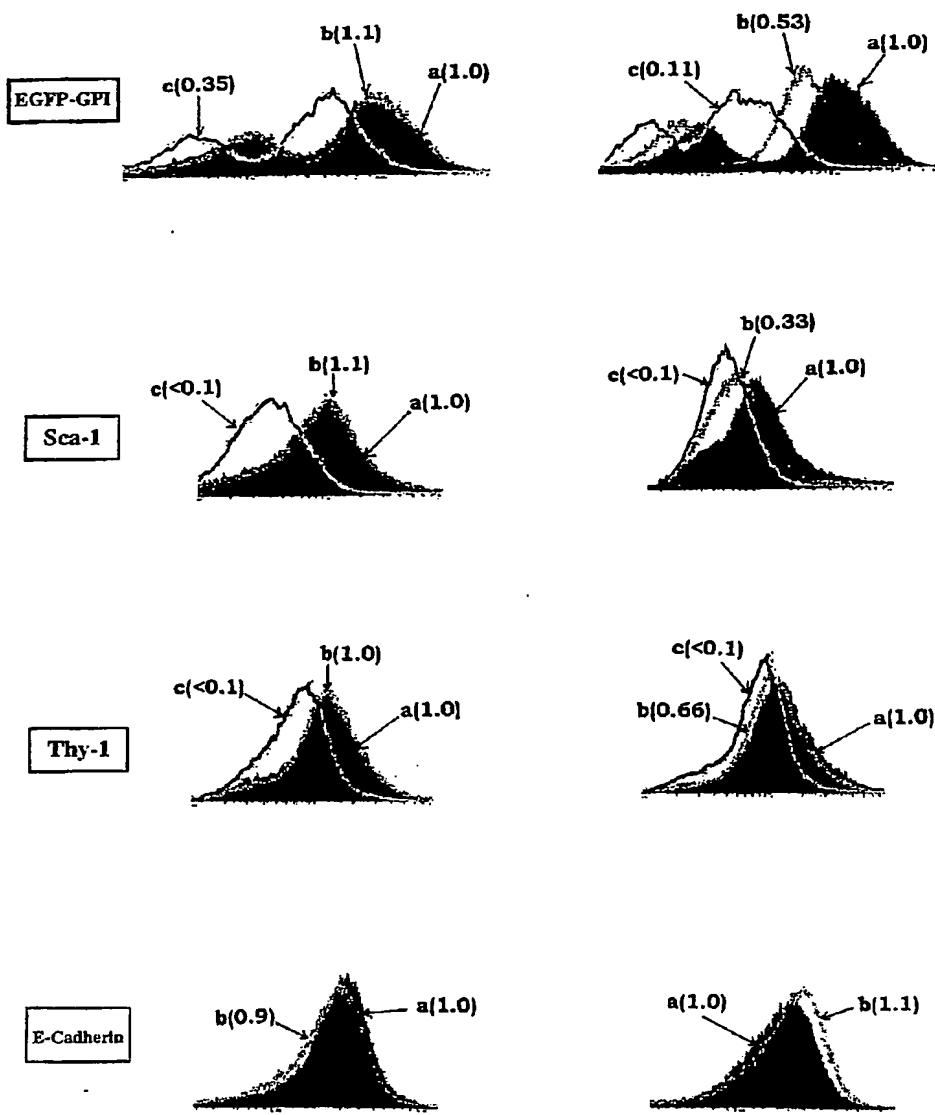
【図7】



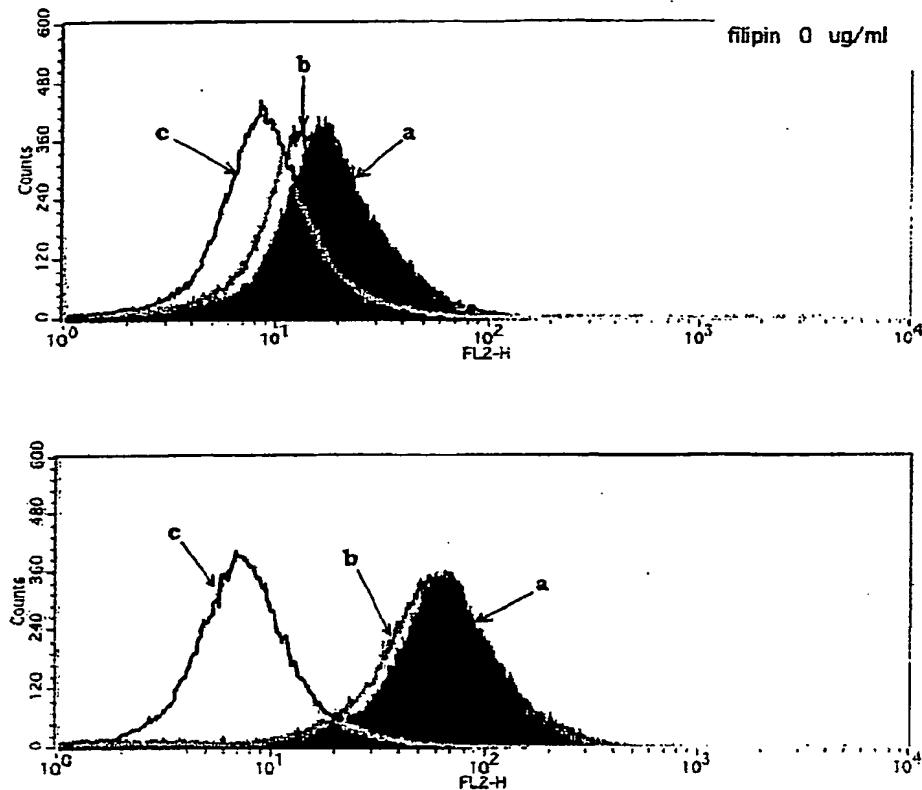
【図8】



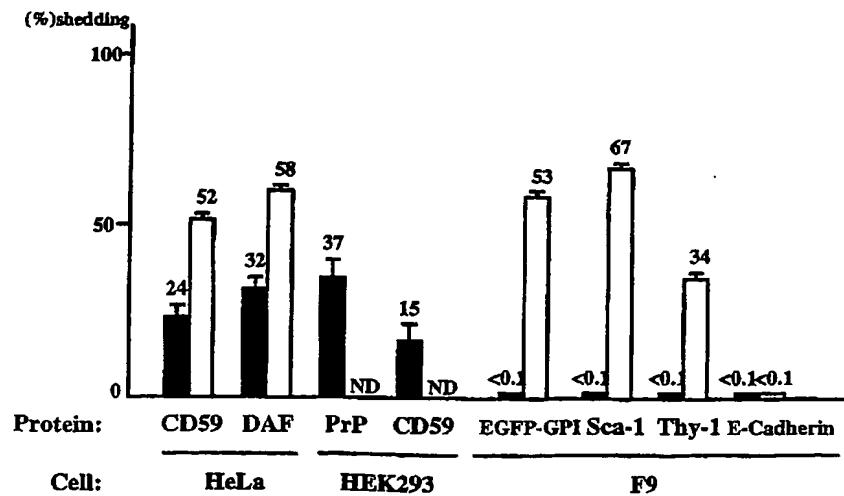
【図9】



【図10】



【図11】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 有害なGPIアンカー型タンパク質を細胞膜から遊離させることによつて各種疾患を予防または治療するための新規薬剤を提供する。

【解決手段】 アンギオテンシン変換酵素を含有し、GPIアンカー型タンパク質を細胞膜から遊離させることを作用機序とする、プリオント性疾患または細菌感染疾患等の予防または治療用薬剤。

【選択図】 なし

特願2002-314078

出願人履歴情報

識別番号 [502392249]

1. 変更年月日 2002年10月29日

[変更理由] 新規登録

住所 京都府京都市左京区岡崎北御所町18番地  
氏名 近藤 玄

## (12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004年5月13日 (13.05.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/039396 A1

(51) 国際特許分類7: A61K 38/46, 45/00, A61P 15/00, 25/28, 31/04, 43/00, C12N 9/64, 15/57

(81) 指定国(国内): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/013851

BG, BR, BY, BZ, CA, CII, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) 国際出願日: 2003年10月29日 (29.10.2003)

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(25) 国際出願の言語: 日本語

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

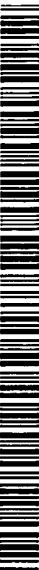
(26) 国際公開の言語: 日本語

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガイドの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(30) 優先権データ:  
特願 2002-314078

2002年10月29日 (29.10.2002) JP

(71) 出願人および

(72) 発明者: 近藤 玄 (KONDOH,Gen) [JP/JP]; 〒606-8336  
京都府 京都市 左京区岡崎北御所町 18 番地 Kyoto  
(JP).(74) 代理人: 西澤 利夫 (NISHIZAWA,Toshio); 〒107-0062  
東京都 港区 南青山6丁目11番1号 スリーエフ南青山  
ビルディング7F Tokyo (JP).

A1

(54) Title: DRUG CONTAINING ANGIOTENSIN CONVERTASE

(54) 発明の名称: アンギオテンシン変換酵素含有薬剤

(57) Abstract: A drug for preventing or treating prion diseases, bacterial infection, infertility and so on which contains an angiotensin convertase specifically cleaving a GPI anchor of cell membrane or a peptidase-inactivated mutant enzyme thereof and has a function mechanism of releasing a GPI anchor type protein from cell membrane.

WO 2004/039396 A1

(57) 要約: 細胞膜のGPIアンカーを特異的に切断するアンギオテンシン変換酵素もしくはそのペプチダーゼ活性不活性化変異型酵素を含有し、GPIアンカー型タンパク質を細胞膜から遊離させることを作用機序とする、ブリオン性疾患、細菌感染疾患または不妊症等の予防または治療用薬剤。

## 明細書

## アンギオテンシン変換酵素含有薬剤

5

## 技術分野

この出願の発明は、アンギオテンシン変換酵素を含有する薬剤に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、GPI アンカー型タンパク質を細胞膜から遊離させることを作用機序とし、プリオントン性疾患や細菌感染疾患、精子異常による不妊症等の予防または治療に有用な薬剤に関するものである。

## 背景技術

15

アンギオテンシン変換酵素 [angiotensin-converting enzyme : ACE。酵素学的にはジペプチジルカルボキシペプチダーゼ (EC 3.4.15.1) ] は、レニン・アンギオテンシン・アルドステロン血圧制御系の一員で、アンギオテンシン I を活性化型のアンギオテンシン II に変換するとともに、ブラディキニンを分解不活性化することによって様々な生理活性の変化 (例えば、血圧上昇) を生じさせることが知られている (非特許文献 1)。このため、ACE 阻害を薬理作用とする薬剤 (例えば、血圧降下剤) や ACE 阻害剤等の発明が数多く存在する (例えば、特許文献 1 - 4)。

一方、細胞の表面を構成する細胞膜はタンパク質と脂質を主成分とし、エネルギーの生産、刺激の伝達、細胞間相互作用、分泌などの多彩な生命機能を営む場である。GPI アンカー型タンパク質は GPI アンカーを介して細胞膜に結合するその主要な構成成分であり、上記の生命機能維持の一翼を担っている重要な分子群である。しかしある方で、細胞膜の GPI アンカーには正常型プリオントンタンパク質が結合しており、この正常型プリオントンに異常型プリオントンが結合するとクロイツフェルト・ヤコブ病、Grestmann-Straussele 症候群、クルー病等のいわゆる「プリオントン性疾患」の原因

となる。また、GPI アンカーに結合するリボポリサッカライド (LPS) 受容体 CD14 には菌体毒素 LPS が結合し、細胞障害の原因となっている。

さらに、哺乳類の精子一卵子透明体の結合による受精成立時において、精子細胞膜 5 の GPI アンカーに結合したタンパク質（マウスの事例では PH-20 や TEPS5 等、非特許文献 2 および 3）の遊離が必須であるが、GPI アンカーからそれらタンパク質の切り離しを行う機能が欠損した異常精子を持つ雄性不妊症が知られている。

従って、プリオン性疾患や細菌感染、精子異常による不妊症等に対する症状の緩和 10 や治療においては、GPI アンカー型タンパク質を細胞膜から遊離させることが有効である。GPI アンカーカット活性 (GPIase 活性) を示すタンパク質としては、哺乳類においては、唯一 GPI-PLD が知られている。しかし、GPI-PLD は細胞内で GPI-PLD を発現する場合に限って、GPIase 活性を示すことが、培養細胞を用いた研究により報告されている（非特許文献 4）。すなわち GPIase 活性の医薬への利用という 15 観点から、外来性の GPI-PLD は有効に作用した事例がない。

なお、ACE はアンギオテンシン I およびプラディキニン以外の基質、例えばエンケファリン、ならびにヘプタペプチドおよびオクタペプチドのエンケファリン前駆体を切断する。また、トリデカペプチド、ニューロテンシンをジペプチドおよびウンデカペプチドに加水分解し、さらにはサブスタンス P を切断不活性化することが知られている（非特許文献 5）。しかしながら、ACE が GPI アンカー型タンパク質を細胞表面から GPI アンカータンパク質から切断遊離することは、従来、全く知られていない。

25 特許文献 1：特開平 10-036391 号公報  
特許文献 2：特開 2001-064299 号公報  
特許文献 3：特開 2001-233789 号公報  
特許文献 4：特開 2002-138100 号公報  
非特許文献 1：Hooper et al., Int. J. Biochem. 23:641-647, 1991  
30 非特許文献 2：Honda et al., J. Biol. Chem. 277:16976-16984, 2002

非特許文献 3 : Lin et al., J. Cell Biol. 125:1157-1163, 1994

非特許文献 4 : Tujioka et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 251:737-747, 1998

非特許文献 5 : Skidgel et al., *Neuropeptides and Their Prptidases*, Turner AJ 5 Ed., Chichester, UK, 1989

### 発明の開示

10 この出願の発明者は、GPI アンカー型タンパク質遊離活性を有する物質を探索し、この物質がアンギオテンシン変換酵素（ACE）であることを見出した。

この発明は、発明者による以上のとおりの新規な知見に基づくものであり、有害な GPI アンカー型タンパク質を細胞膜から遊離させることによって各種疾患を予防または治療するための新規薬剤を提供することを課題としている。

さらに、従来 ACE は既知の生理活性（たとえば血圧上昇などを起こすペプチダーゼ活性）が有害であることから、それを抑制するための研究が多様に行われてきていた。ACE を実用的薬剤として提供するにあたり、この出願の発明者は有害なペプチダーゼ活性を抑制し、目的とする GPI アンカー型タンパク質遊離活性のみを有効に利用しうる ACE を提供することを課題としている。

この出願は、前記の課題を解決するための発明として、アンギオテンシン変換酵素を含有し、GPI アンカー型タンパク質を細胞膜から遊離させることを作用機序とする 25 アンギオテンシン変換酵素含有薬剤を提供する。

この発明の薬剤は、好ましくは、プリオン性疾患、細菌感染疾患または精子異常にによる不妊症の予防または治療用としての薬剤である。

30 この発明の薬剤の一つの態様は、含まれるアンギオテンシン変換酵素が、GPI アン

カ一型タンパク質遊離活性を保持させたまま、アンギオテンシン変換酵素活性を失活させるアミノ酸変異を導入した変異型酵素、好ましくはそのアミノ酸配列中の His Glu Met Gly His 配列におけるいずれか 1 以上のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換した変異酵素、さらに好ましくはそのアミノ酸配列中の His Glu Met Gly His 配列における Glu を Asp に置換した変異型酵素を含む薬剤である。

この出願はまた、GPI アンカ一型タンパク質遊離活性を保持させたまま、アンギオテンシン変換酵素活性を失活させるアミノ酸変異を導入した変異型アンギオテンシン変換酵素を提供する。

10

この変異型酵素は、そのアミノ酸配列中の His Glu Met Gly His 配列におけるいずれか 1 以上のアミノ酸残基、好ましくは His Glu Met Gly His 配列における Glu を Asp に置換した酵素である。

15

この発明において、「GPI アンカ一型タンパク質」とは、細胞膜の GPI アンカ一に結合するタンパク質であり、例えば、プリオニ性疾患に関係する正常型または異常型プリオニ、菌体毒素 LPS の受容体 CD14 等である。

20

「GPI アンカ一型タンパク質を細胞膜から遊離させる」とは、細胞膜の GPI アンカ一に結合している GPI アンカ一型タンパク質を GPI アンカ一から切断分離させて、不活性化させることを意味する。これによって、例えば GPI アンカ一型タンパク質である正常型プリオニが細胞膜から遊離され、正常型プリオニに結合してプリオニ性疾患の原因となる異常型プリオニが細胞膜に結合することが防止される。また、菌体毒素 LPS の受容体 CD14 が細胞膜から遊離されるため、膜型 CD14-LPS 複合体の形成が阻害され、LPS による細胞障害や炎症反応の拡大が防止または改善される。

「プリオニ性疾患」は、例えば、クロイツフェルト・ヤコブ病、Grestmann-Straussele 症候群、クルー病等である。

30

「細菌感染疾患」は、例えば、グラム陰性菌（大腸菌、インフルエンザ桿菌、サル

モネラ菌、髄膜炎菌、緑膿菌等)による感染症であり、またそれらの細胞毒によるエンドトキシンショック等の炎症性疾患等である。

「精子異常による不妊症」は、たとえば TEPS5 や PH-20 等の精子細胞膜表面に存在する GPI アンカー型タンパク質を、卵との会合時に遊離できることによる受精不成立を特徴とする精子異常を示す雄性の不妊症である。

なお、この発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能である。例えば、薬剤の調製は Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990、遺伝子工学および分子生物学的技術は Sambrook and Maniatis, in Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989; Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y, 1995) 等に記載されている。

#### 図面の簡単な説明

20 図 1 は、EGFP-GPI 遺伝子導入マウスの精巣における蛍光局在化を観察した顕微鏡像である。EGFP-GPI の生殖細胞 (Gc) 発現は第 2 系統 (Lane 2) マウスに見られたが、第 1 (示さず) および第 3 系統マウスには見られなかった。Ly はライディヒ細胞。倍率は 200 倍。

25 図 2 は、EGFP-GPI 遺伝子導入マウスの精巣における EGFP-GPI タンパク質の溶解度を調べた電気泳動像である。界面活性剤を添加した溶解緩衝液 (Tx-114+) または界面活性剤非添加の溶解緩衝液 (Tx-114-) を用いて組織を可溶化し、溶解産物の一部をウエスタンプロット解析した。EGFP-GPI が界面活性剤非存在下で積極的に可溶化したのは、第 2 系統マウスの精巣においてのみであった。水溶性タンパク質の大きさ (Ln.2, Tx-114-) が界面活性剤可溶性の膜アンカータンパク質 (Ln.2,

Tx-114+) と同等であった点は特記すべきである。F9 は F9 トランスフェクタント、NTg は対照としての非トランスジェニックである。

図 3 は、連続液体クロマトグラフィーにより精製された GPI アンカータンパク質遊離活性を示す分子。TSK gel 3000SW ゲルろ過カラムから溶出したピーク分画 (Frac.) より、SDS-PAGE と銀染色によって、100kDa の単一バンドとして単離された。

図 4 は、精製組換え ACE (ACE-T) 市販製品 (ACE-S) 、PI-PLC およびバッファーのみと反応させた PLAP のイムノプロッティング。Input は反応の基質である。

図 5 は、ACE 反応の用量依存性を測定した結果である。部分精製した PLAP を様々な濃度の ACE-S と反応させ、水溶相の PLAP 活性を測定した。値は平均値士 SD、n=3 である。0 mU/ml を対照とした。Student's t 検定による有意差水準は、\* : P<0.01、\*\* : p<0.05 である。最下段は 10<sup>-3</sup>M カプトブリルを添加した場合の反応である。

図 6 は、ACE と反応させた PLAP のイムノプロッティングによる GPI アンカータンパク質遊離活性の測定結果である。E414D はペプチダーゼ活性中心の Glu414 を Asp に置換した変異体 ACE、WT は野生型の ACE-T。Buffer は PLAP をバッファーのみと反応させた対照。活性のユニット数は表.1 に示す方法で求めた。Input は反応の基質である。

図 7 は、ペプチダーゼ活性 (Pase) の測定結果。E414D はペプチダーゼ活性中心の Glu414 を Asp に置換した変異体 ACE、WT は野生型の ACE-T。活性測定手順は Kasahara and Ashihara, Clin Chem. 27:1922-1925 に記載された測定方法に従った。

図 8 は、filipin 前処理 (右) または非処理 (左) 条件下で、EGFP-GPI をトランسفエクションした F9 細胞を 1.0 U/ml の ACE-S により処理し、EGFP-GPI、

Sca-1、Thy-1 および E-カドヘリンの細胞表面発現を FACS 分析した結果である。filipin 処理後には GPI アンカータンパク質の発現は減少していたが（細胞数の左シフト）、膜貫通型 E-カドヘリンは減少していないことが分かり、またそれらの程度は異なっていた（遊離%：EGFP-GPI は 53%、Sca-1 は 67%、Thy-1 は 34%）。5 a は ACE(-)、b は ACE (+)、c は PI-PLC 処理を行ったもの。各ラインの数値は中央値（Mean）である。

図 9 は、EGFP-GPI を発現する F9 細胞へ ACE または PI-PLC 処理を行った場合に観察される GFP 蛍光の顕微鏡写真。ACE は EGFP-GPI を細胞表面から切断している。ゴルジ体の GFP 蛍光は減衰していない。倍率 200 倍。「PBS」は ACE および PI-PLCX 未処理の対照である。10

図 10 は、HeLa 細胞を filipin 前処理（右）または非処理（左）で、1.0U/ml の ACS-S または 2.8U/ml の PI-PLC を用いて処理し、細胞表面の CD59 および DAF 15 の発現を FACS 分析した結果である。ACE 処理によってタンパク質の発現は減少したが（細胞数の左シフト）、その程度は異なっていた（CD59 は 66%、filipin 処理後の DAF は 58%）。

図 11 上図は、プリオントンタンパク質（PrP）を結合した HEK293 細胞を 1.0 U/ml の ACE-S により処理し、プリオントンタンパク質の遊離を FACS 分析した結果である。20 下図は、対照として CD59 の遊離を分析した結果である。

図 12 は filipin 処理を行った HeLa 細胞を様々な濃度の ACE-S 存在下でインキュベートし、CD59 の細胞表面発現を FACS 分析し、遊離%を算出した結果である。25 値は平均値±SD、n=3 である。0 U/ml を対照とした。Student's t 検定による有意差水準は、\* : P<0.005、\*\* : p<0.01 である。

図 13 は filipin 処理した HeLa 細胞を、表示されたカプトプリル用量の存在下、10<sup>-7</sup> M の ACE ベブチドに相当する 0.2U/ml の ACE-S と共にインキュベートし、30 CD59 の細胞表面発現を FACS 分析した結果である。値は平均値±SD、n=3 である。

カプトリル 0 M を対照とした。Student's t 検定による有意差水準は、\* : P<0.01、\*\* : p<0.05 である。

図 14 は、各種の細胞における ACE の各種タンパク質の遊離活性を比較した。図 5 8、図 10 および図 11 の結果の要約となる。ACE は膜タンパク質である E-カドヘリンを除き、様々な内在性 GPI アンカー型タンパク質を切断放出する。EGFP-GPI を発現する F9 細胞では EGFP-GPI、Sca-1、Thy-1 および E-カドヘリンを、HeLa 細胞では CD59 および DAF を、HEK293 細胞では CD59 とブリオンタンパク質 (PrP) をそれぞれ FACS 分析で解析した。値は平均値±SD、n=3 である。ND は 10 未測定である。

図 15 は、遊離タンパク質中に含まれる GPI アンカー型断片の同定。EGFP-GPI を発現する F9 細胞を  $^{32}$ P リン酸もしくは  $^3$ H エタノールアミンで代謝ラベルし、フィリピンを処理を行った後に、ACE-S、PI-PLC または mGK (マウス腺性カリクレイン) による処理を行った。遊離された EGFP-GPI タンパク質を抗 GFP 抗体で精製、SDS-PAGE で分離後、ニトロセルロース膜に転写した。遊離した EGFP-GPI タンパク質の総量は EGFP イムノプロットによる検出バンドの強度により求めた。また放射線解析では矢印で示した部分で同一のバンドが確認された。タンパク質重量あたりの放射線強度を計算し、ACE 処理サンプルを 1.0 として遊離したタンパク質に含まれるそれぞれの標識化合物の相対量として表示した。ACE 処理サンプルでは Rapid migrating band がいくつか認められるが、これは F9 細胞中に存在する何らかの酵素による切断によるものである。

図 16 は、GPI アンカー糖鎖骨格におけるリン酸およびエタノールアミンの結合部位、および PI-PLC、GPI-PLD、mGK の切断部位を示した模式図である。Man はマンノース、GlcNc はグルコサミン、Ino はイノシトール、黒い太線は脂肪鎖を示す。

図 17 は、正常マウスおよび ACE ノックアウトマウス精巣上体由来の精子を、水溶性画分 X すなわちアクリソームなどの水溶性成分 (WS) と、細胞膜を構成する 30 タンパク質などの界面活性剤可溶性 (難水溶性) 画分 (DS) に分配し、SDS-PAGE

により分離し、それぞれの抗体を用いてイムノプロットを行った。アクロシンおよびファーティリン $\beta$ は、ともに精子Xに存在し、それぞれ WS、DS の指標タンパク質として用いた。理由は不明だが、ACE ノックアウトマウス精子ではファーティリン $\beta$ の発現が正常マウス精子での発現にくらべて低くなっている。 $+/+$ は正常精子、 $-/-$ は ACE ノックアウト精子を示す。

図 18 は、ACE ノックアウトマウス精子に対して、様々な処理を行ったのちに精子を卵（透明体）へ結合させた顕微鏡写真。倍率は 200 倍。前処理に使用した物質はそれぞれの写真に示した。ACE-WT は野生型 ACE、ACE-E414D はペプチダーゼ活性を不活性化させた変異体 ACE、Inositol-P は PI-PLC の阻害剤である。Buffer は前処理にバッファーを用いる対照実験である。

図 19 は、図 18 における卵に結合した精子の数をグラフ化したものである。値は平均士SE（標準誤差）で、平均値をグラフ上に数値で示した。凡例は図 18 と同じである。それぞれの実験を行った卵子の数はそれぞれ、Buffer が 18、ACE-WT が 20、ACE-E414D が 17、PI-PLC が 18、PI-PLC+Inositol-P は 18、Inositol-P が 17 である。student's t 検定による有意差水準は、対照実験（Buffer）と比較して、\*:  $P<0.005$ 、\*\*:  $p<0.01$  である。また ACE-WT と ACE-E414D 間では  $P<0.3$ 、ACE-WT と PI-PLC 間では  $P<0.5$ 、PI-PLC と PI-PLC+Inositol-P 間では  $P<0.05$  であった。これとは別個に行った実験でも同様の結果を得た。

#### 発明を実施するための最良の形態

この発明において使用する ACE は、ヒトをはじめとする各種哺乳動物の細胞（体細胞や精巣細胞）から公知の方法によって単離することができる（体細胞型 ACE-S、精巣型 ACE-T）。また、市販品（例えば、ウサギ肺由来の ACE-S: Sigma A-6778 等）や、特表 2002-525108 号公報に開示されているアンギオテンシン変換酵素相同物を使用することもできる。さらに、この ACE は各種の動物から単離されたものがそれぞれのアミノ酸配列およびそれをコードするポリヌクレオチド（cDNA 配列）

と共に以下のとおりに知られている。すなわち、ヒト ACE-S (GenBank/J04144)、ヒト ACE-T (GenBank/M26657)、ヒト ACE アイソフォーム 3 前駆体 (GenBank/NM\_152831)、ヒト ACE アイソフォーム 2 前駆体 (GenBank/NM\_152830)、ヒト ACE アイソフォーム 1 前駆体 (NM\_000789)、  
5 ヒト ACE 様タンパク質 (GenBank/NM\_021804)、マウス ACE-T (GenBank/NM\_009598)、マウス ACE-S (GenBank/XM\_110936)、ラット ACE (GenBank/NM\_012544)、ラット肺由来 ACE (GenBank/NM\_012544)、ラット ACE-T (GenBank/AF539425)、ウサギ ACE-T (Swissprot/P22968)、  
ウサギ ACE-S (Swissprot/P12822)、ニワトリ (GenBank/Q10751)、ウシ ACE (Swissprot/1919242A)、イエバエ ACE 前駆体 (Swissprot/I0715)、シヨウジョウバエ ACE (GenBank/NM\_165070) 等である。従って、この発明で使用する ACE は、前記の公知アミノ酸配列に基づいて公知の固相ペプチド合成法により化学合成して作製することもできる。あるいは、ACE をコードするポリヌクレオチドを *in vitro* 転写翻訳系や適当な宿主-ベクター系で発現させることによって、  
10 組換え ACE として取得することができる。ポリヌクレオチド (例えば ACE cDNA) は前記 GenBank データベースや特表 2002-525108 号公報の塩基配列情報に基づき作製したオリゴヌクレオチドプローブを用いて既存の cDNA ライブラリーをスクリーニングする方法や、オリゴヌクレオチドプライマーを用いた RT-PCR 法等の公知の方法により取得することができる。

20

例えば組換え ACE を *in vitro* 転写翻訳で作製する場合には、前記ポリヌクレオチドを、RNA ポリメラーゼプロモーターを有するベクターに挿入して発現ベクターを作製し、このベクターを、プロモーターに対応する RNA ポリメラーゼを含むウサギ網状赤血球溶解物や小麦胚芽抽出物などのインビトロ翻訳系に添加する。RNA ポリメラーゼプロモーターとしては、T7、T3、SP6 などが例示できる。これらの RNA ポリメラーゼプロモーターを含むベクターとしては、pKA1、pCDM8、pT3/T7 18、  
25 pT7/3 19、pBluescript II などが例示できる。

組換え ACE を、大腸菌などの微生物で発現させる場合には、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、DNA クローニング部位、ターミネーター等を有する発現ベクターに前記の DNA 断片を組換えた発現ベクターを作成  
30

し、培養物から融合ペプチドを単離する。大腸菌用発現ベクターとしては、pUC 系、pBluescript II、pET 発現システム、pGEX 発現システムなどが例示できる。

また組換え ACE を真核細胞で発現させる場合には、前記の融合ポリヌクレオチドを、プロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する真核細胞用発現ベクターに挿入して組換えベクターを作成し、真核細胞内に導入すれば、融合ペプチドを形質転換真核細胞で発現させることができる。発現ベクターとしては、pKA1、pCDM8、pSVK3、pMSG、pSVL、pBK-CMV、pBK-RSV、EBV ベクター、pRS、pcDNA3、pMSG、pYES2 などが例示できる。真核細胞としては、サル腎臓細胞 COS7、チャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO などの哺乳動物培養細胞、出芽酵母、分裂酵母、カイコ細胞、アフリカツメガエル卵細胞などが一般に用いられるが、目的とするタンパク質を発現できるものであれば、いかなる真核細胞でもよい。

発現ベクターを宿主細胞に導入するには、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAE デキストラン法など公知の方法を用いることができる。

融合ペプチドを原核細胞や真核細胞で発現させたのち、培養物から組換え ACE を単離精製するためには、公知の分離操作を組み合わせて行うことができる。例えば、尿素などの変性剤や界面活性剤による処理、超音波処理、酵素消化、塩析や溶媒沈殿法、透析、遠心分離、限外濾過、ゲル濾過、SDS-PAGE、等電点電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーなどが挙げられる。

またこの発明において使用する ACE は、GPI アンカー型タンパク質遊離活性を保持させたまま、アンギオテンシン変換酵素活性（血圧上昇等のペプチダーゼ活性）を失活させるアミノ酸変異を導入した変異型 ACE であってもよい。すなわち、ACE は血圧制御因子として働き、血圧上昇を引き起こす。そのため ACE を投与した場合には、その主作用としての GPI アンカー型タンパク質遊離とともに、副作用としての血圧上昇等を引き起こす危険性がある。この発明の変異型 ACE は、1 または複数のアミノ酸残基を欠失または付加、若しくは他のアミノ酸残基に置換することによって、

目的とする主作用を保持したまま、好ましくない副作用を低減または消失させることを可能とする。

変異型 ACE は、公知の ACE アミノ酸配列（例えば配列番号 4）に基づき、公知の固相ペプチド合成法（例えば Organic Syntheses Collective Volumes, Gilman, et al. (Eds) John Wiley & Sons, Inc., NY）に従って様々な変異型ペプチドを作製し、あるいは変異導入型の PCR 法や公知の Kunkel 法 (Kunkel, T. A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488, 1985 および Kunkel, T. A., et al. Methods in Enzymology 154:367, 1987) に従って作製した変異型ポリヌクレオチドを適当な宿主ベクター系で発現させることによって様々な変異型ペプチドを作製し、後記の試験方法によってそのペプチダーゼ活性および GPIase を試験することによって、目的とする変異型を得ることができる。

従って、変異型 ACE のアミノ酸変異導入部位は適宜に設計することができるが、この発明では、その一例として、ACE アミノ酸配列における His Glu Met Gly His 配列（配列番号 4 の 413-417 位）のいずれか 1 以上のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換した変異型 ACE を好ましいものとして例示する。すなわちこの配列領域は、ACE のペプチダーゼ活性に必須な Zn の配位に深く関係する配列であり、哺乳類（ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ウシ）、鳥類（ニワトリ）、昆虫（ハエ）など、現在報告されている ACE において、ACE-T および ACE-S 問わず、ほぼ完全に保存されている。そしてこの発明においては、特に好ましい変異型 ACE として、Glu Met Gly His 配列における Glu を Asp に置換した変異型 ACE（以下「ペプチダーゼ活性欠損 ACE (E414D)」と記載することがある）を提供する。

この発明の薬剤は、実施的に ACE 単独であってもよいが、疾患の種類や薬剤の投与形態に応じて、薬剤的に許容される担体と混合して調製することが好ましい。すなわち、この発明の薬剤は、非経口的または経口的な投与に適した剤型となるような担体と混合することができる。

非経口投与は、局所注入、腹腔内投与、選択的静脈内注入、静脈注射、皮下注射、30 腸器灌流液注、直腸投与等であり、例えば注射剤としての製剤化する場合の担体とし

では、滅菌水、塩溶液、グルコース溶液、または塩水とグルコース溶液の混合物等を使用することができる。また緩衝剤 pH 調節剤（リン酸水素ナトリウム、クエン酸等）、等張化剤（塩化ナトリウム、グルコース等）、保存剤（パラオキシ安息香酸メチル、P-ヒドロキシ安息香酸プロビル等）等の製薬補助剤を含有することもできる。

5 このように製剤化した薬剤は、細菌保持フィルターを通す濾過、組成物への殺菌剤の混入、組成物の照射や加熱によって滅菌することができる。また粉末状態で製剤化し、使用時に前記液体担体と混合して注射液を調製するようにしてもよい。

経口投与剤は胃腸器官による吸収に適した剤形（例えば、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、粉末剤、または懸濁剤やシロップ剤のような経口液体調製物等）に製剤化する。担体としては、常用の製薬補助剤、例えば結合剤（シロップ、アラビアゴム、ゼラチン、ソルビット、トラガカント、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルセルロース等）、賦形剤（ラクトース、シュガー、コーンスターク、リン酸カルシウム、ソルビット、グリシン等）、滑沢剤（ステアリン酸マグネシウム、タルク、ポリエチレングリコール、シリカ等）、崩壊剤（ポテトスターク、カルボキシメチルセルロース等）、潤滑剤（ラウリル硫酸ナトリウム等）を使用することができる。ストロベリー・フレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加することもできる。また錠剤は常法によりコーティングすることができる。経口液剤は水溶液またはドライプロダクトにすることができる。そのような経口液剤は常用の添加剤、例えば保存剤（p-ヒドロキシ安息香酸メチルもしくはプロビル、ソルビン酸等）を包含していてもよい。

ACE の含有量は対象疾患やその投与形態に応じて適宜とすることができるが、通常は 5~100%(w/w)、好ましくは 10~60%(w/w) の範囲とすることができる。

25

この発明の薬剤の投与量は、患者の年齢や体重、症状、投与経路等によって異なるが、ACE 量として 100~200mg/kg/day 程度とすることができる。なお、ACE は人体に存在するタンパク質であり、その安全性については問題がない。

30

## 実施例

以下、実施例として ACE 活性について試験した結果を記載し、この発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この発明は以下の例によって限定されるもので  
5 はない。

## 1. 材料と方法

## 1.1. 組織学的分析

10 GPI アンカー-GFP (EGFP-GPI) 遺伝子導入マウス (Kondoh, G. et al. FEBS lett. 458, 299-303, 1999) をフェノバルビタールにより麻酔し、左心室経由で 4%(W/V) パラホルムアルデヒド-PBS を灌流させることにより固定した。切除した組織を 4% パラホルムアルデヒド-PBS 中で再度固定し、20% スクロース-PBS 中で 4℃ で 48 時間にわたりインキュベートした。次に組織断片を Tissue-Tek O.C.T. 化合物  
15 (Sakura Finetek, Torrance, CA) 中に埋め込み、ドライアイスで急速冷凍し、低温槽上で 5-10  $\mu$ m 厚に切断した。標本の調査は、GFP 特異的フィルタを用いた蛍光顕微鏡 (Olympus, Tokyo) を用いて行った。

## 1.2. 破碎細胞サンプルの調製

20 Complete TM プロテアーゼ阻害剤 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) 存在下、氷冷状態の TNE 溶液 (10mM Tris-HCl pH7.8, 1mM EDTA, 150mM NaCl) 中で細胞と組織を超音波破碎に纏めてポリトロンホモジナイザーで ホモジナイズした。ホモジネートは 100,000×g で遠心分離し、上清を収集した (水溶性分画)。沈殿は TNE 緩衝液中で洗浄し、次に 1% TritonX-114 (Nacalai  
25 tasque, Kyoto, Japan) -TNE 溶液中、Complete TM プロテアーゼ阻害剤の存在下でホモジナイズを行い、100,000×g で遠心分離し、上清を収集した (界面活性剤可溶性分画)。精子サンプルは破碎前に TYH 培地に 1 時間おいて受精能獲得処理を行った。

30 1.3. イムノプロット

各組織の両方の分画を非還元状態で SDS-PAGE に供し、ニトロセルロース膜に電気泳動的に転写し、抗 GFP (MBL, Nagoya, Japan) 、PLAP(Biomed)、抗 TEPS5、および抗 PH-20 それぞれのウサギポリクローナル抗体、および抗ファーティリン  $\beta$  マウスモノクローナル抗体によるプローブ処理を行い、ECL システム (Amersham Bioscience, Piscataway, USA) を用いて染色の検出を行った。

#### 1.4. PLAP 変換アッセイ

非イオン化界面活性剤の TritonX-114 が、37°C の条件で水溶性分子と界面活性剤可溶性の疎水性分子を分配する性質を利用した。PLAP 変換アッセイを用いて、精製途中における GPI アンカータンパク質遊離活性のモニタリングを行った。PLAP は、COS7 細胞中で cDNA を発現させて緩衝液 (20mM Tris pH8.0、150mM NaCl、1% TritonX-114、Complete TM プロテアーゼ阻害剤) により抽出することにより調製し、37°C で分配した後で界面活性剤可溶性の相を収集した。次に DEAE-セルロース陰イオン交換液体クロマトグラフィー (LC) (溶出バッファー : 20mM Tris pH8.0、0.1% TritonX-100、0mM~500mM NaCl 勾配) 、抗-PLAP 抗体カラム (抗体 : ウサギポリクローナル抗-PLAP 抗体 (Biomed) ; カラム : Hitrap NHS-Activated HP (Amersham Bioscience) ; 溶出バッファー : 100mM グリシン pH2.8) で PLAP を精製した。界面活性剤可溶性の PLAP タンパク質を基質に用いてアッセイを行った。PLAP 活性の測定は、アルカリホスファターゼ検出キット (Nacalai tesque, Kyoto) を用いて製造元のプロトコルに従って行った。変換反応は、100mM Tris pH7.5、5mM CaCl<sub>2</sub>、150mM NaCl および 0.1U の PLAP の条件で、90 分にわたり 37°C で実施した。反応停止は TritonX-114 を最終濃度 2% となるように添加することで行い、試料を 25°C で微小遠心分離した。水溶相を収集し、PLAP 活性を測定した。またこれはポリクローナル抗-PLAP 抗体を用いたイムノプロッティングにも用いた (Biomed, Foster City, USA)。

#### 1.5. GPI アンカータンパク質遊離活性物質の精製

成熟した ICR マウスの精巣 500 個を莢から出し、カミソリを用いて  $\sim 1\text{mm}^3$  の断片に切断した。生殖細胞の単離はピペット吸引の反復により行った。軽い遠心により 30 輸精管を除去した後、上清を収集し、1500  $\times g$  で遠心分離することによりさらに沈

降させた。沈殿は 10 倍量の緩衝液 (3mM Tris pH7.4、2mM MgCl<sub>2</sub>、1mM EDTA、0.25M スクロース、および Complete TM プロテアーゼ阻害剤を含む) 中で破碎および超音波処理を行い、ホモジネートを 100,000×g で 1 時間にわたり遠心分離した。その沈殿を 10 倍量の緩衝液 (20mM Tris pH8.0、1% TritonX-100、および 5 Complete TM プロテアーゼ阻害剤を含む) 中で可溶化した。溶解産物は超遠心 (100,000×g) で 1 時間にわたり分離を行い、上清を収集した。この試料を以下の連続液体クロマトグラフィーにより精製した。

(1) DEAE-セルロース (Seikagakukogyo, Tokyo) ; 緩衝液 (20mM Tris pH8.0、0.1% TritonX-100、0mM～500mM NaCl 勾配) で溶出。

10 (2) フェニルセファロース X CL-4B (Amersham Bioscience, Piscataway, USA) : 緩衝液 (20mM Tris pH7.5、0.1% TritonX-100) で溶出。

(3) ConA-セファロース 4B (Amersham Bioscience, Piscataway, USA) ; 緩衝液 (20mM Tris pH7.5、0.1% TritonX-100、150mM NaCl、500mM methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (Seikagakukogyo, Tokyo)) で溶出。

15 (4) TSK ゲル 3000SW (Tosoh, Tokyo) ; 緩衝液 (20mM Tris pH7.5、0.1% TritonX-100、300mM NaCl) で溶出。

#### 1.6. プロテオミクス分析

精製ペプチドを SDS-PAGE により分離し、ゲル中でトリプシンまたは 0.1M 臭化 20 シアンを含む 70% ホルマリン溶液で消化し、キャビラリーHPLC (Magic) および イオン捕集マススペクトル分析 (ThermoFinnigan) に供した。それぞれの得られたシグナルに対して Sequest および Mascot 検索を行った。S マススペクトルで識別されたペプチドはトリプシン消化逆相 HPLC で分離後、ある程度の量を供出して オートマチックペプチドシーケンサーで同定した。

25

#### 1.7. 細胞培養とトランスフェクション

F9、HeLa および COS7 細胞を、10% FCS を加えた DMEM 培地中で培養した。DNA トランスフェクションにはリポフェクトアミン試薬 (Life Technologies, Rockville, USA) を製造元のプロトコルに従って使用した。

30

### 1.7. ACE 試料

ACE cDNA を、マウス精巣 cDNA をテンプレートとして、  
'5-tgaattccaccatgggccaagggttgggtactccagg-'3' (配列番号 1) および  
'5-gaattcgtcacttatcatcatcatcctataatcctgctgtggctccaggtacaggc-'3 (配列番号 2)  
5 のプライマーセットを用いて RT-PCR により調製した。この PCR 産物は、FLAG を付加した可溶性精巣 ACE のアイソフォームをコードしている。グルタミン酸 414 をアスパラギン酸へアミノ酸置換によりペプチダーゼ活性を不活性化した変異タンパク質の cDNA は、変異導入プライマーとして、  
'5-cttgggtatagcgcaccacgatatggccacatccagtattcatgca-'3 (配列番号 3) を用いた  
10 部位特異的変異誘発により合成した。cDNA の発現には CAAG ベクターを利用した。この ACE cDNA をトランスフェクションした COS7 細胞の培養上清を収集し、組換え ACE を抗-FLAG M2-アガロースアフィニティカラム (Sigma, St. Louis) を用いて精製した。また、ウサギ肺由来 ACE の体細胞アイソフォーム (ACE-S) (Sigma A-6778) を、製造業者の支持する活性単位で使用した。ACE のペプチダーゼ活性は  
15 公知の方法 (Kasahara and Ashihara, Clin Chem. 27:1922-1925, 1981) で行った。

### 1.9. FACS 分析

0.02% EDTA/PBS を用いて細胞を培養皿から剥離させ、1% BSA を含む  
20 Hank' s 調整塩溶液に数回浸した。懸濁した細胞を、適切な時点で 10  $\mu$ g/ml のフィリピン (filipin) /PBS (Sigma, St. Louis) を用いて 0°C で 1 時間にわたり処理した。PBS に浸した後、細胞を ACE または 1.0IU/ml PI-PLC (GLYKO, Novato, USA) または PBS のみで、カプトプリル (Sigma, St. Louis) の存在下または非存在下の条件で、37°C で 1 時間にわたり処理を行った。次に細胞を 1% BSA を含む  
25 PBS に繰り返し浸し、ヒト CD59、ヒト DAF、マウス Sca-1 (Pharmingen-Fujisawa, Tokyo)、マウス Thy1.2 (Pharmingen-Fujisawa, Tokyo)、マウス E-カドヘリン (宝酒造)、ヒトプリオントンパク質 (3F4, Signet Laboratories) に対するビオチン共役抗体を用いて染色し、次にフィコエリトリン共役ストレプトアビジン (Pharmingen-Fujisawa, Tokyo) を用いて染色した。  
30 また、プリオントンパク質 (PrP) の遊離活性は、ヒト胎児由来線維芽細胞

(HEK293 細胞) および抗ヒトプリオンモノクローナル抗体 3F4 (Signet Laboratories, USA) を使用し、前記と同様に染色した。

染色した細胞を FACScan セルソーターに供した。ソートされた細胞の生存度を、  
FSC および SSC チャンネルにより評価した。F9 細胞内で発現した EGFP-GPI は直  
接検出した。切断の定量はそれぞれの細胞における平均の蛍光発光強度より次式によ  
って切断放出 (%) を算出した。

$$\text{切断放出 (\%)} = (\text{ACE}(-) - \text{ACE}(+)) / (\text{ACE}(-) - \text{PI-PLC})$$

すなわち、PI-PLC 処理時の蛍光強度を最大値、ACE(-)での蛍光強度を切断がない  
ものとした。

10

#### 1.10. 放射性標識分析

EGFP-GPI を発現する F9 細胞を 0.2mCi/ml の [<sup>32</sup>P]-オルトリン酸 (Amersham Bioscience) もしくは 0.1mCi/ml の [<sup>3H</sup>]-エタノールアミン (Amersham Bioscience) で 16 時間処理し代謝による標識を行った。フィリピン処理を行った細  
胞を、0.5 μM ACE、1.0IU/mlPI-PLC、マウス腺性カリクレイン (mGK : EGFP  
を C 末端近傍で切断する酵素) を含む頸下腺の 10% ライセートのいずれかで 1 時間  
37°Cで処理した。遊離した EGFP を抗 GFP 抗体で免疫沈降させ、SDS-PAGE を行  
い、ニトロセルロース膜に転写した。EGFP-GPI タンパク質の量は、デンシトメト  
リー (Molecular Device) での EGFP イムノプロットで検出された EGFP-GPI のバ  
ンド強度の測定、および同じバンドについて液体シンチレーションカウンタでの放射  
能測定により行った。

#### 1.11. 精子-卵結合能測定

全ての生殖細胞 TYH 培地中で取扱いおよび静置をおこなった。同腹の正常マウス  
および ACE 欠損マウスから精巣上体を摘出し、250 μl の培地を加え刻んだ。精子を  
15 分間泳がせた後に、1.5ml 培地に移し替え、すくなくとも 1 時間以上培養した。  
卵細胞は過排卵された C57BL/6 マウスの卵管から採取し、THY 培地で積層細胞を  
除去するために 1mg/ml のヒアルロニダーゼ (Sigma) で処理した。培養した精子  
(約 2.0 × 10<sup>6</sup> 個/ml) 次の試薬で 90 分、それぞれ処理した。野生型 ACE(ACE-  
WT) 0.2U/ml、ACE-E414D 0.2U/ml、PI-PLC 1.0IU/ml、4mM イノシトールモ

ノリン酸 (Sigma) をふくむ PI-PLC 1.0ml、4mM イノシトールモノリン酸のみ、または PBS バッファーのみ。生殖細胞はミネラルオイルで表面を覆った TYH 培地中で 1 時間インキュベートし、PBS で穏やかに 4% 洗浄後、パラホルムアルデヒドを含む PBS で固定し、卵-精子結合能測定に供した。卵細胞は 200 倍の光学顕微鏡 5 (オリンパス) で観察し、卵子に集合してきた精子の数は、卵子の直径がもっとも大きく見える焦点にあわせてカウントした。

## 2.結果と考察

### 10 2.1. 遺伝子導入マウスとその GPI タンパク質

図 1 は、EGFP-GPI 遺伝子導入マウスの精巣の蛍光シグナルを撮影した写真像である。生殖細胞 (Gc) における EGFP-GPI の発現は第 2 系統 (Line 2) に見られたが、第 1 および第 3 系統には見られなかった。

図 2 は、遺伝子導入動物の精巣における EGFP-GPI タンパク質の溶解度を解析した結果である。界面活性剤を添加した溶解緩衝液 (Tx-114+) または界面活性剤非添加の溶解緩衝液 (Tx-114-) を用いて組織を可溶化し、溶解産物の一部をウエスタンブロッティングに供した。EGFP-GPI が界面活性剤非存在下で積極的に可溶化したのは、第 2 系統の精巣においてのみであった。水溶性タンパク質の大きさ (Ln.2, Tx-114-) が界面活性剤可溶性の膜アンカータンパク質 (Ln.2, Tx-114+) と同等であった点は特記すべきである。 20

### 2.2. GPI アンカータンパク質放出因子の特定

EGFP-GPI 遺伝子導入マウスを用いて、GPI アンカー膜結合型タンパク質放出因子の同定を行い、目的の活性を有する 100kDa タンパク質を精製した。すなわち、マウス精巣に由来する生殖細胞の膜リッチ分画を 1% Triton X-100 を含む緩衝液中で可溶化し、遠心分離を行って上清を取り、連続液体クロマトグラフィーによる分画に供した。溶出分画に対して PLAP 変換アッセイを行い、その最大値を表 1 に示す。なお、全ての反応は PI-PLC (1.0U/ml) 処理を付随して行い、その値を最大反応として定義した。図 3 は、銀染色によるこの 100kDa タンパク質の単一バンドを示す。 30

表 1

カラム	容量 (ml)	全蛋白 (mg)	全活性 (u*)	特異活性 (u/mg 蛋白)	精製倍率
S-100 上清	393	19100	336160	18	1.0
DEAE-セルロース	8	228	14410	63	3.5
フェニルセファロース	8	212	17596X	83	4.6
ConA-セファロース	1	6	6100	1017	56.5
TSK ゲル 3000SW	1	1	2500	2500	138.9

\*U(unit X)=サンプル値-バックグラウンド値/PI-PLC 値-バックグラウンド値

この精製タンパク質は、プロテオミクス分析により ACE であることを確認した。

5 さらにこの精製タンパク質活性を、組換え ACE および市販品 ACE と比較した。すなわち、組換えタンパク質および市販品 ACE は PLAP を水溶性形態に変換するかを確かめるため、部分精製した PLAP を、精製組換え ACE (ACE-T) または市販製品 (ACE-S) と反応させた。TritonX-114 による分配後、水溶性相の一部を SDS-PAGE に供し、PLAP を免疫プロッティングにより検出した。結果は図 4 に示した通りである。可溶性 PLAP に相当するバンドは PI-PLC 処理を行った試料よりわずかに 10 小さいが、ACE-T および ACE-S 処理サンプルの両方に見ることができる。

また、ACE 反応の用量依存性を。部分精製した PLAP を様々な濃度の ACE-S と反応させ、水溶相の PLAP 活性を測定した。結果は図 5 に示したとおりである。この図 15 に示したとおり、市販品 ACE においてもその活性は用量依存的であり、しかもこの活性は特異的な ACE 阻害剤であるカプトプリルによって阻害された。

ACE の GPI アンカー型タンパク質遊離活性の活性中心について、既知であるペプチダーゼ活性中心の Asp414 を Glu に置換した組替え体 ACE (E414D) を作成し、GPI アンカー型タンパク質遊離活性およびペプチダーゼ活性について測定を行った (図 6、図 7)。その結果、ペプチダーゼ活性は 1/1000 以下に下がったのに対して、 20 GPI アンカー型タンパク質遊離活性は野生型とほとんど変わらなかった。このことより ACE の GPI アンカー型タンパク質遊離活性を担当する活性中心は、ペプチダーゼ活性を示す部位とは別の場所に局在することが示唆された。

### 2.3.GPI アンカー型タンパク質に対する ACE の作用

GPI アンカータンパク質に対する ACE の活性を精査するため、EGFP-GPI を細胞表面で安定に発現する F9 細胞を使用し解析を行った。フィリピン前処理済みのおよび未処理の EGFP-GPI 発現 F9 細胞を 1.0U/ml の ACE-S または 2.8U/ml の PI-PLC により処理し、EGFP-GPI の動態を GFP 蛍光の観察により、また EGFP-GPI、Sca-1、Thy-1 および E-カドヘリンの細胞表面発現を FACS 分析によりそれぞれ解析した。ACE は EGFP-GPI の発現にほとんど影響しないが、フィリピン処理を行った細胞については、ACE 処理により細胞表面から EGFP-GPI のほとんど全てを遊離させた（図 8、9）。実際、GPI アンカー型タンパク質は細胞膜の脂質ラフトに局在化して包含されており、外来性の ACE は脂質ラフトにより基質分子への会合が阻害されているように思われる。他の GPI アンカー型タンパク質、Sca-1、Thy-1 も細胞の ACE 処理によって同様に切断放出されることが確認された。これより、ACE および PI-PLC は、膜貫通型タンパク質である E-カドヘリンには何ら作用を及ぼさないいっぽうで、GPI アンカー型タンパク質に特異的に切断酵素活性を示すことが確認された。

さらに、HeLa 細胞上で CD59 および解離促進因子（DAF）の 2 種類の GPI アンカータンパク質を、HEK293 細胞でプリオンタンパク質をそれぞれ分析対象とし、ACE による切断活性を同様な FACS 分析により調査した（図 10、11）。その結果、これら GPI アンカー型タンパク質がいずれも細胞膜上から切断放出されたことが確認された。さらに、HeLa 細胞での CD59 の ACE の切断活性は、コレステロールブロッキング剤であるフィリピン（filipin）を用いて膜脂質ラフトを崩壊させた場合により明確化し（図 10）、ACE 用量依存的であり（図 11）、またカブトブリルによる阻害された（図 12）。F9 細胞の事例とは対照的に、ACE はヒト細胞上で ACE は、フィリピン処理を行わずとも容易に細胞表面から GPI アンカー型タンパク質を遊離させることが確認された（図 14）。

### 2.4.ACE の GPI アンカー型タンパク質遊離活性における基質切断部位の同定

GFP-GPI を発現する F9 細胞を PLAP とともに ACE 処理し、抗 GFP 抗体カラムで遊離した EGFP-GPI を精製し、トリプシン、臭化シアンもしくは Staphylococcus aureus V8 プロテアーゼを用いた HPLC-マススペクトル解析で C

末端の構造決定を何度か試みたところ、いずれもターゲットペプチドの捕集に失敗し構造決定が不可能であった。これより、遊離した GFP-GPI は C 末端に GPI アンカーの一部が繋がったままの構造であることが推測された。

そこで、GPI アンカーの特定部位を放射ラベルする [<sup>32</sup>P]-リン酸、または [<sup>3</sup>H]-エタノールアミンを用いて、EGFP-GPI を発現する F9 細胞に代謝ラベルを行い、ACE、PI-PLC、mGK でそれぞれ処理したのちに遊離したタンパク質を、EGFP イムノプロットにより検出し、検出されたバンドについてそれぞれの放射線強度を測定した（図 15）。分析は少なくとも 4 回行い、ほぼ同一の結果が得られた。mGK 処理では <sup>32</sup>P または <sup>3</sup>H で放射ラベルされた遊離 EGFP-GPI はどちらも検出されなかつたが、ACE 処理および PI-PLC 処理ではどちらの放射ラベルも検出された。これより ACE 処理産物には GPI アンカー型タンパク質の構造の一部でも存在していることが示された。また、ACE 処理で遊離したタンパク質の放射線強度は、PI-PLC 処理の場合と比較してリン酸ラベルの場合で約 1/3、エタノールアミンラベルの場合で約 1/2 の検出強度だった。図 16 に示したように、GPI アンカー上ではラベルに用いた放射性同位元素は局在化しており、先の検出強度の差分より ACE の切断部位は既知の PI-PLC の切断部位より GPI アンカー型タンパク質に近く、GPI アンカー骨格のアンカー型タンパク質が付加する末端に 3 つ連なっているマンノース付近であることが示唆された。

20 2.5. 卵結合能を欠失した精子への ACE の作用の解析

ACE ノックアウトマウスでは雄性不妊が認められる。ACE ノックアウトマウスの精子は正常の精子と比較して、透明体（zona pellucida）における精子一卵結合能が欠失していることが、XKrege et al., Nature 375:146-148,1995 で、報告されている。

25 受精時に精子から遊離される事が知られている GPI タンパク質、TESP5 と PH-20（非特許文献 3 および 4）を対象として、正常マウスおよび ACE ノックアウトマウス精巣上体由来の精子について、それぞれ水溶性成分（WS）および界面活性剤可溶性画分（DS）に分配し、イムノプロットで分析した（図 17）。精子から遊離した水タンパク質は可溶性画分に分配されるが、正常な精子の水溶性画分（WS）からは TESP5 と  
30 PH-20 の両タンパク質が検出され、ACE ノックアウトマウスの精子では水溶性画分か

らはどちらも検出されなかった。この結果から、ACE は GPI アンカー型タンパク質の放出に必須である可能性が示された。

さらに精子-卵結合における ACE の影響の同定を試みた。前記の正常マウス、および ACE ノックアウトマウス、それぞれの精巣上体由来の精子を、野生型 ACE、ペプチダーゼ活性欠損 ACE (E414D)、PI-PLC でそれぞれ処理し、C57BL/6 マウスの未受精卵に接種した。正常マウスの精子ではこの処理により受精能に何ら影響が見られなかつたが、対照的に卵結合能を欠く ACE ノックアウトマウスの精子では、野生型 ACE、ペプチダーゼ活性欠損 ACE のどちらの ACE 処理においても、精子結合能が大きく回復した（図 18、図 19）。さらに、PI-PLC 処理の場合においても、X PI-PLC に特異的な阻害剤イノシトールモノリン酸 (inositol-P) で (PI-PLC 処理を) 阻害した場合を比較することによって、ACE ノックアウト精子の卵結合能が回復することが明らかとなった。以上より、ACE のもつ GPIase 活性が、受精時における精子の卵結合能に決定的な形で関与していることが結論付けられた。

#### 15 2.6. ACE の GPIase 活性の特徴と利用

GPI アンカーカット活性 (GPIase 活性) を示すタンパク質としては、哺乳類においては、唯一 GPI-PLD が知られている。しかし、GPI-PLD は細胞内で GPI-PLD を発現する場合に限って、GPIase 活性を示すことが、培養細胞を用いた研究により報告されている (Tujioka et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 251:737-747, 1998)。すなわち GPIase 活性の医薬への利用という観点から、外来性の GPI-PLD は有効に作用した事例がない。一方で、ACE はヒトの培養細胞や組織に添加するだけで、細胞膜の構造を薬剤処理等で破壊することなく、容易に GPI アンカー型タンパク質を能率的に遊離することができるという優れた特性をもつ。

ACE の GPIase 活性の優れたもうひとつの特性は、その GPI アンカーカット部位である。図 16 の模式図に示した GPI アンカーの構造における切開部位は、成熟 GPI アンカーにおいては、イノシトールのヒドロキシル基への脂肪酸付加 (アシル化) がよく起こる。GPI-PLD の切開部位はイノシトールの直近であるため (図 16 および Hagaman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 95:2552-2557, 1998) X 切断できない。実際、アシル化が顕著な健全赤血球では、GPI-PLD によって解離促進因子 (DAF) の切開ができない (Davitz et al., J. Biol. Chem., 264: 13760-13764,

1989）。一方、ACE は GPI-PLD とは対照的に GPI アンカーのアンカー型タンパク質結合末端側を切断するため、HeLa 細胞において DAF の遊離させたことからもイノシトールへの脂肪鎖付加による阻害を受けにくいことは明らかである。

さらに、GPIase 活性を示すタンパク質としてはバクテリア由来の PI-PLC が知ら  
5 れているが、GPIase 活性をヒトに対する薬剤として使用する場合に、ACE はヒト体内に通常広く分布していることから、きわめて安全性が高いと考えられる。

また ACE は血圧制御因子として働き、血圧上昇を引き起こす。そのため ACE を  
阻害する薬理作用を持つ医薬品（血圧降下剤）やペプチダーゼ活性の阻害についての  
研究がすすめられてきた。ウサギ体細胞由来 ACE (ACE-S) およびマウス精巣由来  
10 ACE (ACE-T) の変異型 ACE (E414D) の試験結果は、ACE の副作用を制圧して、  
目的とする活性のみを利用することが可能であることを明確に示した。

#### 産業上の利用可能性

15

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、GPI アンカー型タンパク質を細胞膜から遊離させることによって、プリオン性疾患、炎症性疾患、細菌感染性疾患、精子の卵結合能不足による雄性不妊症等を効果的に予防または治療することでの  
きる薬剤が提供される。

20

## 請求の範囲

1. アンギオテンシン変換酵素を含有し、GPI アンカー型タンパク質を細胞膜から遊離させることを作用機序とするアンギオテンシン変換酵素含有薬剤。

5

2. プリオン性疾患の予防または治療用である請求項 1 の薬剤。

3. 細菌感染疾患の予防または治療用である請求項 1 の薬剤。

10 4. 精子異常による不妊症の予防または治療用である請求項 1 の薬剤。

5. アンギオテンシン変換酵素が、GPI アンカー型タンパク質遊離活性を保持させたまま、アンギオテンシン変換酵素活性を失活させるアミノ酸変異を導入した変異型アンギオテンシン変換酵素である請求項 1 から 4 のいずれかの薬剤。

15

6. 変異型アンギオテンシン変換酵素が、そのアミノ酸配列中の His Glu Met Gly His 配列におけるいずれか 1 以上のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換した変異酵素である請求項 5 の薬剤。

20 7. 変異型アンギオテンシン変換酵素が、そのアミノ酸配列中の His Glu Met Gly His 配列における Glu を Asp に置換した変異酵素である請求項 6 の薬剤。

8. ペプチダーゼ活性を失活させるアミノ酸変異を導入した変異型アンギオテンシン変換酵素。

25

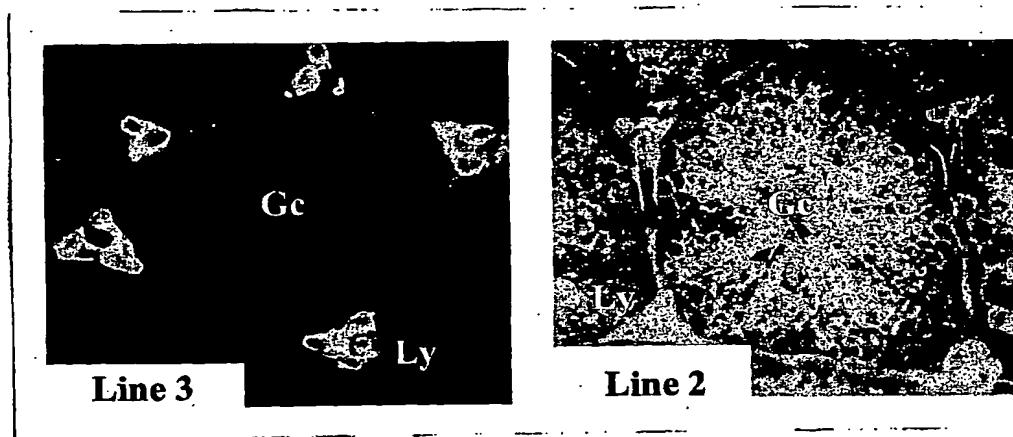
9. そのアミノ酸配列中の His Glu Met Gly His 配列におけるいずれか 1 以上のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換した請求項 8 の変異型アンギオテンシン変換酵素。

30 10. そのアミノ酸配列中の His Glu Met Gly His 配列における Glu を Asp に置換

した請求項 9 の変異型アンギオテンシン変換酵素。

1/12

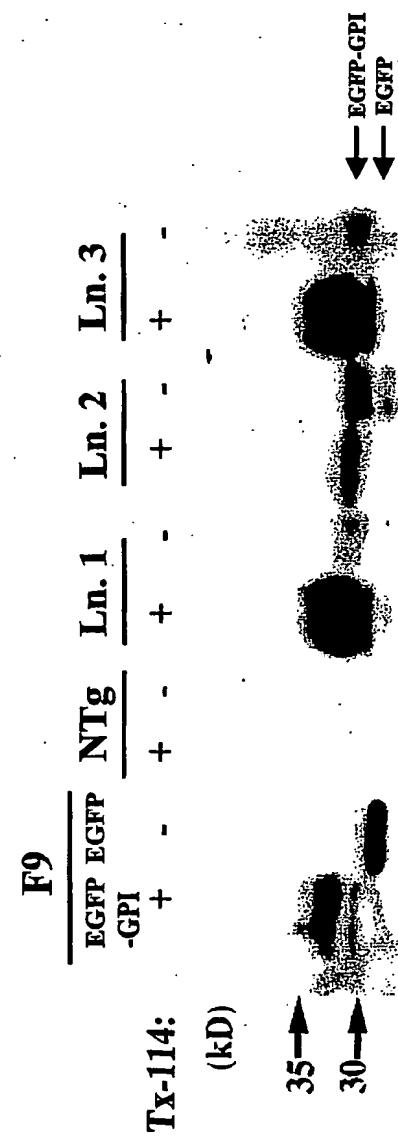
図 1



差替え用紙(規則26)

1/12/1

図 2



2/12

図 3

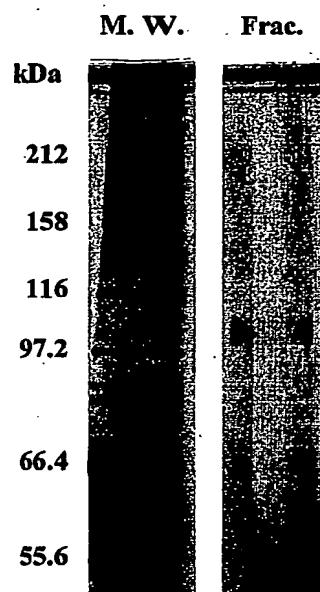
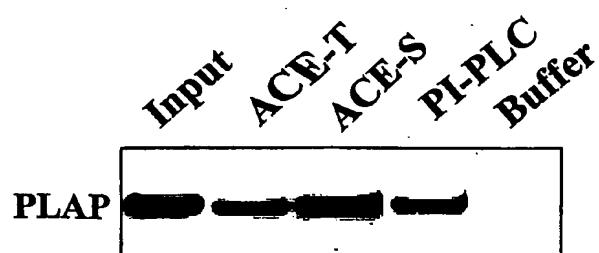


図 4



差替え用紙(規則26)

3/12

図 5

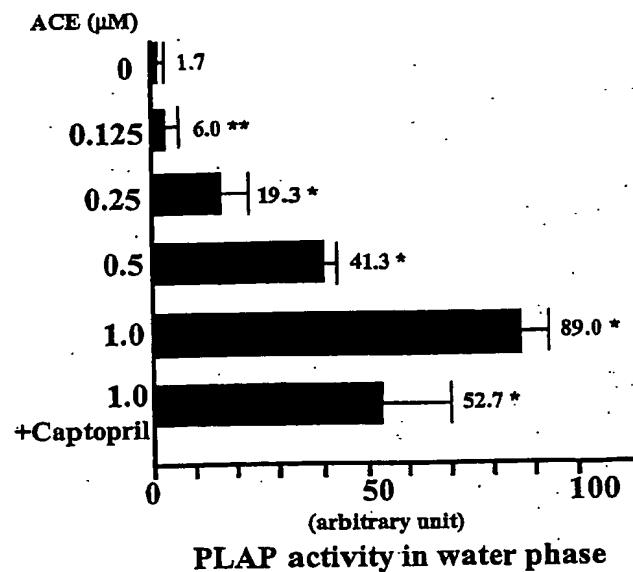
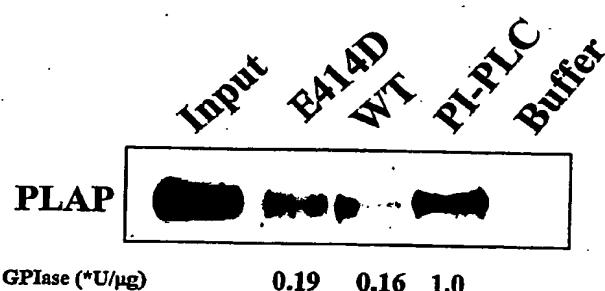


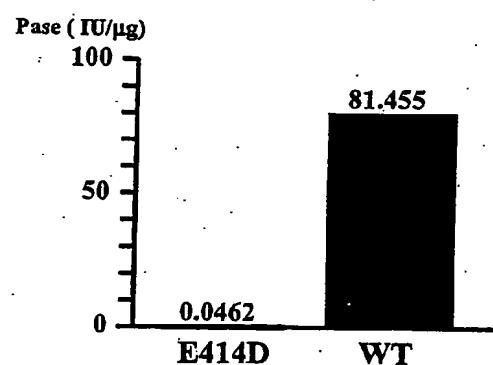
図 6



差替え用紙(規則26)

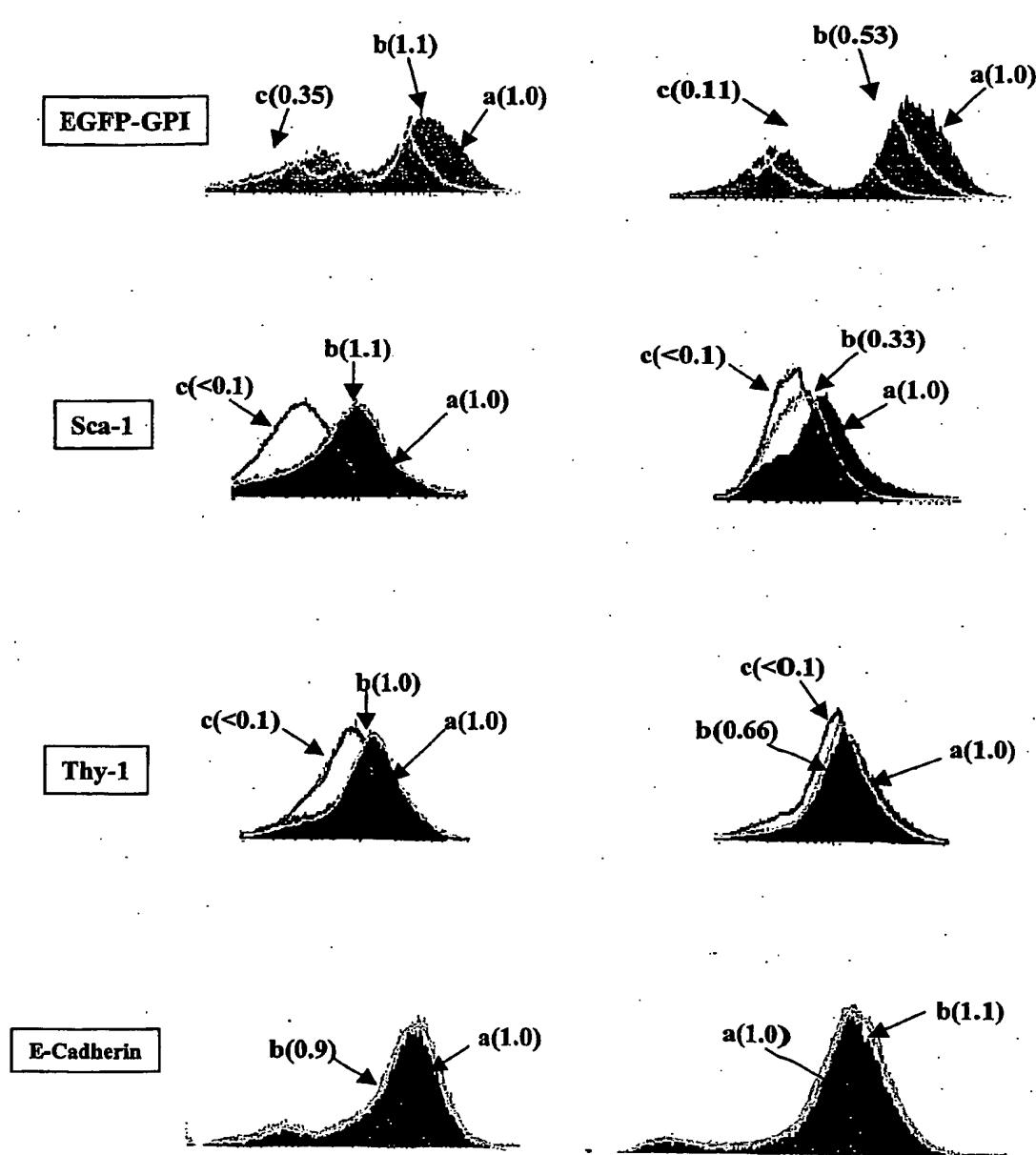
4/12

図 7



5/12

図 8



差替え用紙(規則26)

6/12

図 9

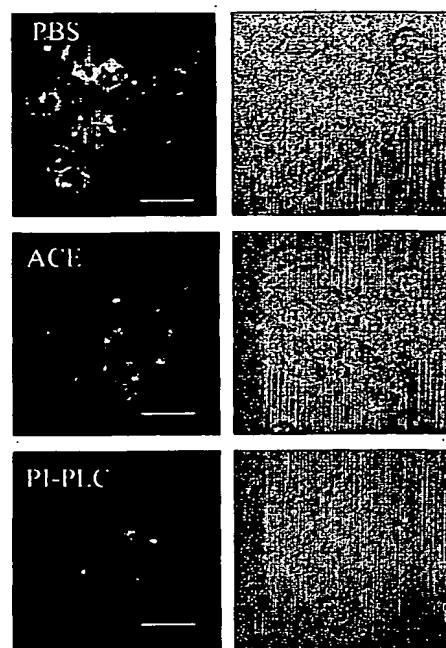
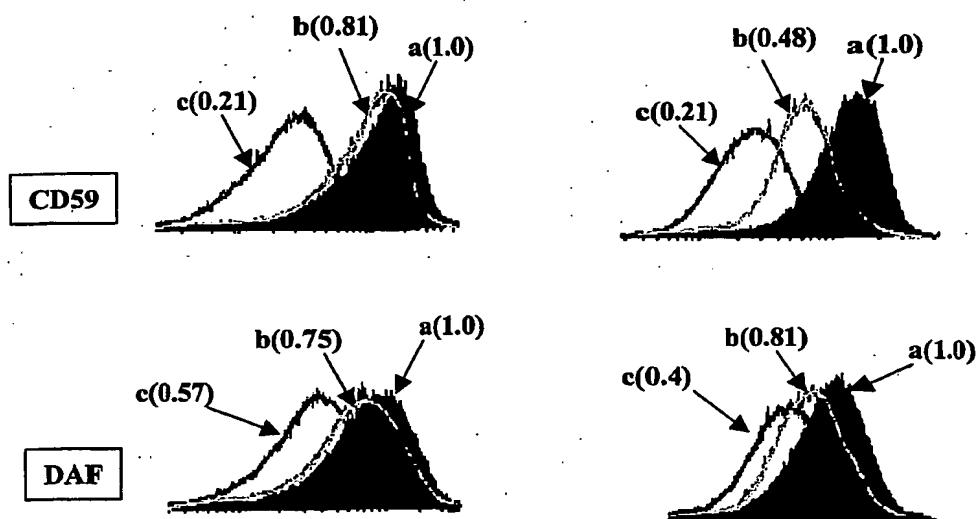


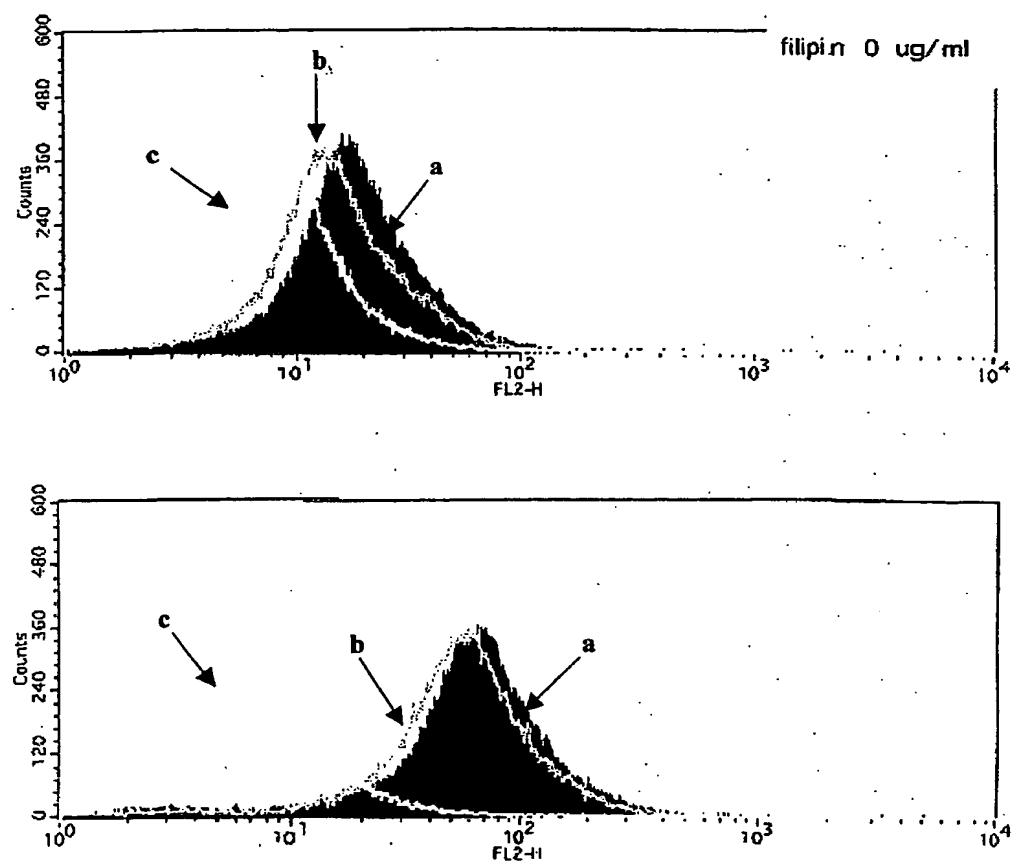
図 10



差替え用紙(規則26)

7/12

図 11



差替え用紙(規則26)

8/12

図 1 2

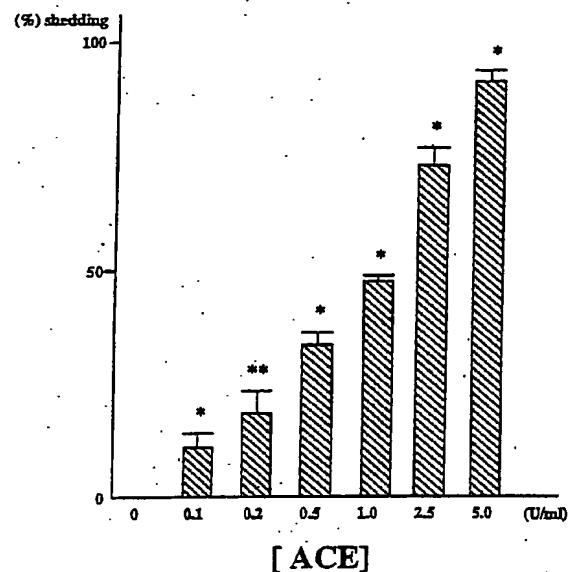
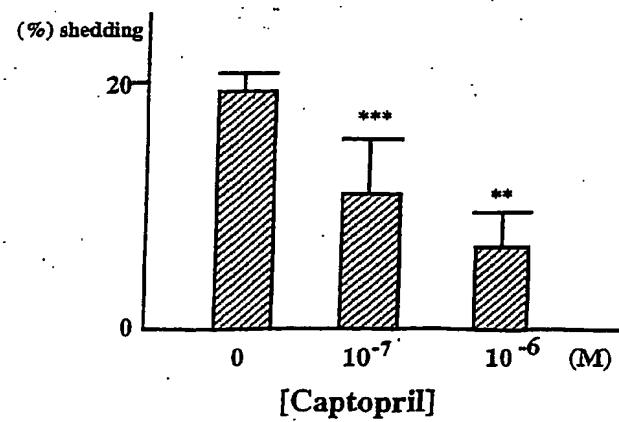
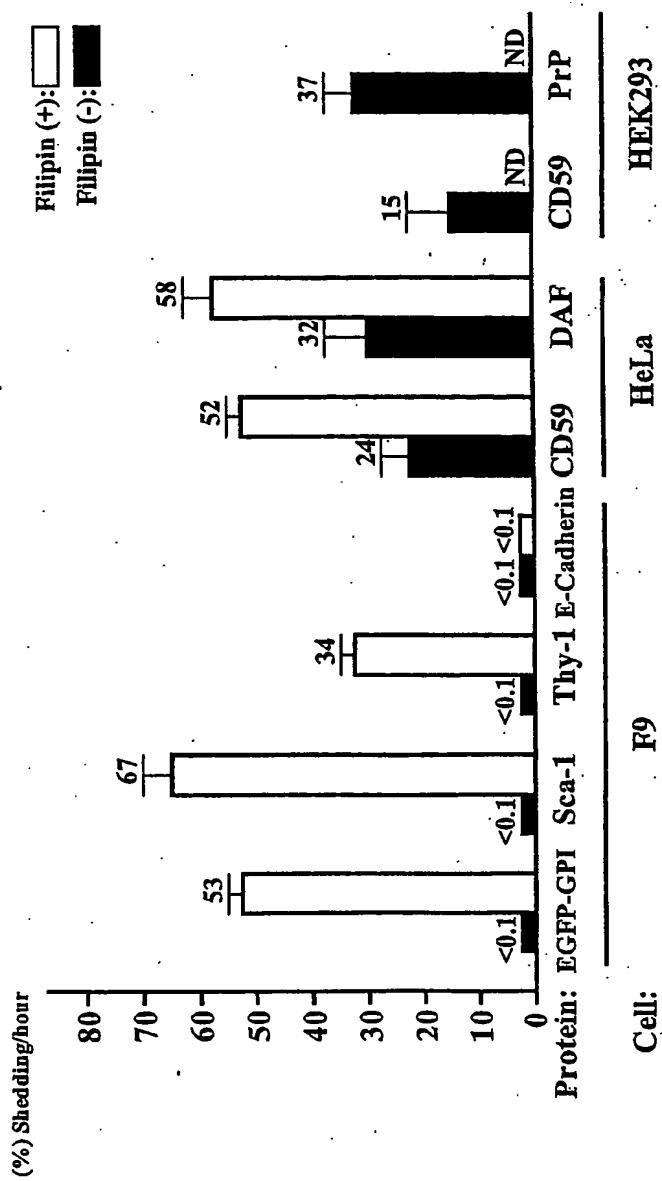


図 1 3



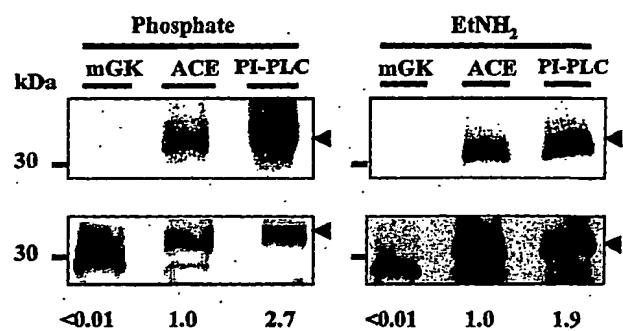
9/12

図 14



10/12

図 15



### 差替え用紙(規則26)

11/12

図 16

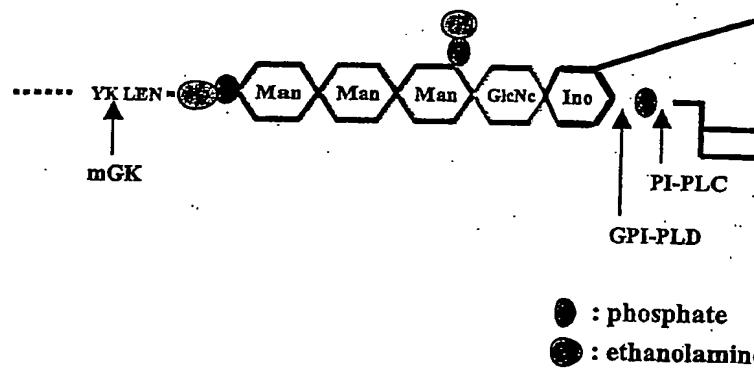
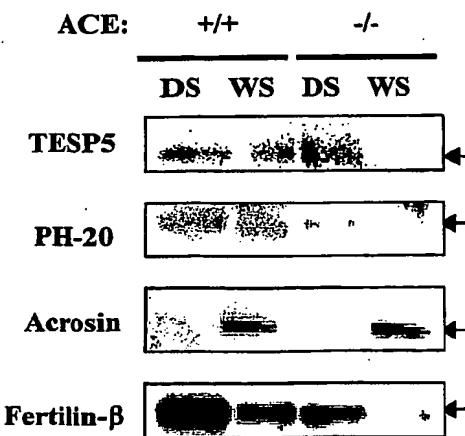


図 17



差替え用紙(規則26)

12/12

図 18

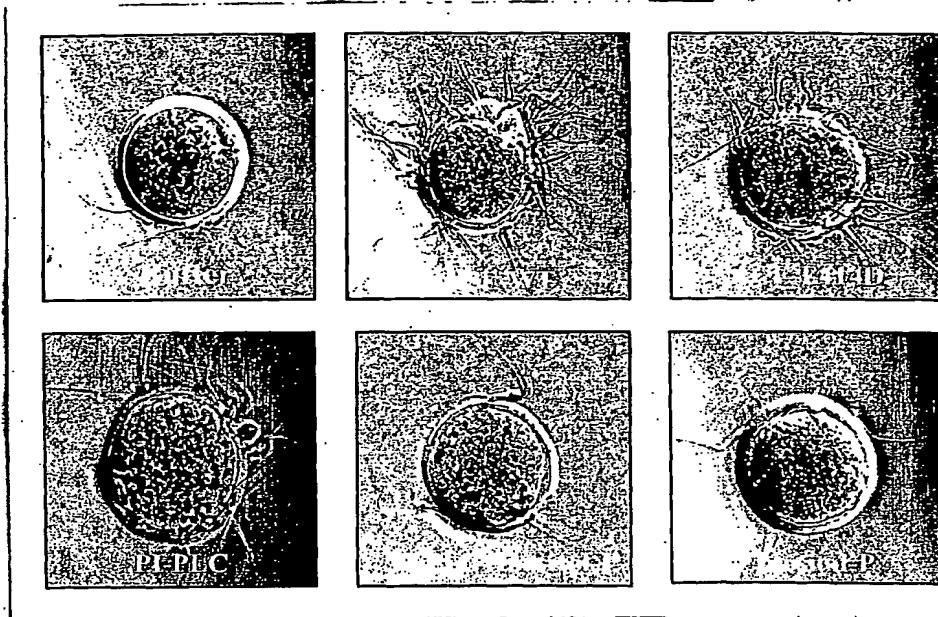
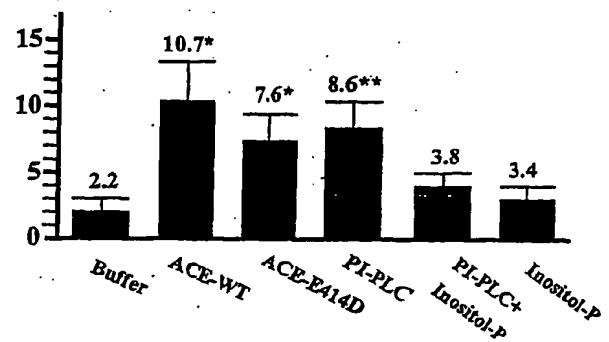


図 19

No. Sperm/Egg



差替え用紙(規則26)

1/5  
SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Kondoh, Gen

&lt;120&gt; ACE containing drug

&lt;130&gt; 03-F-060PCT

&lt;150&gt; JP 2002-314078

&lt;151&gt; 2002-10-29

&lt;160&gt; 4

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

&lt;400&gt; 1

tgaattccac catgggccaa gtttggctta ctccagg

37

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 57

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

&lt;400&gt; 2

gaattcgtca cttatcatca tcatccttat aatcctgctg tggctccagg tacaggc

57

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 57

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 3

cttggtgatag cgcaccacga tatgggccac atccagtatt tcatgca

57

&lt;210&gt; 4

2/5

&lt;211&gt; 764

&lt;212&gt; PRT

<213> *Mus musculus*

&lt;300&gt;

&lt;308&gt; GenPept/NP\_033728

&lt;309&gt; 2003-10-04

&lt;400&gt; 4

Met Gly Gln Gly Trp Ala Thr Pro Gly Leu Pro Ser Phe Leu Phe Leu  
1 5 10 15

Leu Leu Cys Cys Gly His His Leu Leu Val Leu Ser Gln Val Ala Thr  
20 25 30

Asp His Val Thr Ala Asn Gln Gly Ile Thr Asn Gln Ala Thr Thr Arg  
35 40 45

Ser Gln Thr Thr His Gln Ala Thr Ile Asp Gln Thr Thr Gln Ile  
50 55 60

Pro Asn Leu Glu Thr Asp Glu Ala Lys Ala Asp Arg Phe Val Glu Glu  
65 70 75 80

Tyr Asp Arg Thr Ala Gln Val Leu Leu Asn Glu Tyr Ala Glu Ala Asn  
85 90 95

Trp Gln Tyr Asn Thr Asn Ile Thr Ile Glu Gly Ser Lys Ile Leu Leu  
100 105 110

Glu Lys Ser Thr Glu Val Ser Asn His Thr Leu Lys Tyr Gly Thr Arg  
115 120 125

Ala Lys Thr Phe Asp Val Ser Asn Phe Gln Asn Ser Ser Ile Lys Arg  
130 135 140

Ile Ile Lys Lys Leu Gln Asn Leu Asp Arg Ala Val Leu Pro Pro Lys  
145 150 155 160

Glu Leu Glu Glu Tyr Asn Gln Ile Leu Leu Asp Met Glu Thr Thr Tyr  
165 170 175

Ser Leu Ser Asn Ile Cys Tyr Thr Asn Gly Thr Cys Met Pro Leu Glu  
180 185 190

Pro Asp Leu Thr Asn Met Met Ala Thr Ser Arg Lys Tyr Glu Glu Leu

3/5

195	200	205
Leu Trp Ala Trp Lys Ser Trp Arg Asp Lys Val Gly Arg Ala Ile Leu		
210	215	220
Pro Phe Phe Pro Lys Tyr Val Glu Phe Ser Asn Lys Ile Ala Lys Leu		
225	230	235
Asn Gly Tyr Thr Asp Ala Gly Asp Ser Trp Arg Ser Leu Tyr Glu Ser		
245	250	255
Asp Asn Leu Glu Gln Asp Leu Glu Lys Leu Tyr Gln Glu Leu Gln Pro		
260	265	270
Leu Tyr Leu Asn Leu His Ala Tyr Val Arg Arg Ser Leu His Arg His		
275	280	285
Tyr Gly Ser Glu Tyr Ile Asn Leu Asp Gly Pro Ile Pro Ala His Leu		
290	295	300
Leu Gly Asn Met Trp Ala Gln Thr Trp Ser Asn Ile Tyr Asp Leu Val		
305	310	315
320		
Ala Pro Phe Pro Ser Ala Pro Asn Ile Asp Ala Thr Glu Ala Met Ile		
325	330	335
Lys Gln Gly Trp Thr Pro Arg Arg Ile Phe Lys Glu Ala Asp Asn Phe		
340	345	350
Phe Thr Ser Leu Gly Leu Leu Pro Val Pro Pro Glu Phe Trp Asn Lys		
355	360	365
Ser Met Leu Glu Lys Pro Thr Asp Gly Arg Glu Val Val Cys His Pro		
370	375	380
Ser Ala Trp Asp Phe Tyr Asn Gly Lys Asp Phe Arg Ile Lys Gln Cys		
385	390	395
400		
Thr Ser Val Asn Met Glu Asp Leu Val Ile Ala His His Glu Met Gly		
405	410	415
His Ile Gln Tyr Phe Met Gln Tyr Lys Asp Leu Pro Val Thr Phe Arg		
420	425	430
Glu Gly Ala Asn Pro Gly Phe His Glu Ala Ile Gly Asp Ile Met Ala		
435	440	445

4/5

Leu Ser Val Ser Thr Pro Lys His Leu Tyr Ser Leu Asn Leu Leu Ser  
450 455 460

Thr Glu Gly Ser Gly Tyr Glu Tyr Asp Ile Asn Phe Leu Met Lys Met  
465 470 475 480

Ala Leu Asp Lys Ile Ala Phe Ile Pro Phe Ser Tyr Leu Ile Asp Gln  
485 490 495

Trp Arg Trp Arg Val Phe Asp Gly Ser Ile Thr Lys Glu Asn Tyr Asn  
500 505 510

Gln Glu Trp Trp Ser Leu Arg Leu Lys Tyr Gln Gly Leu Cys Pro Pro  
515 520 525

Val Pro Arg Ser Gln Gly Asp Phe Asp Pro Gly Ser Lys Phe His Val  
530 535 540

Pro Ala Asn Val Pro Tyr Val Arg Tyr Phe Val Ser Phe Ile Ile Gln  
545 550 555 560

Phe Gln Phe His Glu Ala Leu Cys Arg Ala Ala Gly His Thr Gly Pro  
565 570 575

Leu His Lys Cys Asp Ile Tyr Gln Ser Lys Glu Ala Gly Lys Leu Leu  
580 585 590

Ala Asp Ala Met Lys Leu Gly Tyr Ser Lys Pro Trp Pro Glu Ala Met  
595 600 605

Lys Leu Ile Thr Gly Gln Pro Asn Met Ser Ala Ser Ala Met Met Asn  
610 615 620

Tyr Phe Lys Pro Leu Thr Glu Trp Leu Val Thr Glu Asn Arg Arg His  
625 630 635 640

Gly Glu Thr Leu Gly Trp Pro Glu Tyr Asn Trp Ala Pro Asn Thr Ala  
645 650 655

Arg Ala Glu Gly Ser Thr Ala Glu Ser Asn Arg Val Asn Phe Leu Gly  
660 665 670

Leu Tyr Leu Glu Pro Gln Gln Ala Arg Val Gly Gln Trp Val Leu Leu  
675 680 685

Phe Leu Gly Val Ala Leu Leu Val Ala Thr Val Gly Leu Ala His Arg  
690 695 700

5/5

Leu Tyr Asn Ile Arg Asn His His Ser Leu Arg Arg Pro His Arg Gly  
705 710 715 720

Pro Gin Phe Gly Ser Glu Val Glu Leu Arg His Ser Leu Ala His Arg  
725 730 735

Leu Tyr Asn Ile Arg Asn His His Ser Leu Arg Arg Pro His Arg Gly  
740 745 750

Pro Gin Phe Gly Ser Glu Val Glu Leu Arg His Ser  
755 760

## SEQUENCE LISTING

<110> Kondo, Gen

<120> ACE containing drug

<130> 03-F-060PCT

<140> PCT/JP2003/013851

<141> 2003-10-29

<150> JP 2002-314078

<151> 2002-10-29

<160> 4

<210> 1

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 1

tgaattccac catggccaa ggttggctt cttcagg

37

<210> 2

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 2

gaattcgtca cttatcatca tcatccttat aatcctgctg tggctccagg tacaggc

57

<210> 3

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

tttgtatag cgccaccacga tatggccac atccagtatt tcatgca

57

<210> 4  
 <211> 764  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

<300>  
 <308> GenPept/NP\_033728  
 <309> 2003-10-04

<400> 4

Met Gly Gln Gly Trp Ala Thr Pro Gly Leu Pro Ser Phe Leu Phe Leu  
 1 5 10 15

Leu Leu Cys Cys Gly His His Leu Leu Val Leu Ser Gln Val Ala Thr  
 20 25 30

Asp His Val Thr Ala Asn Gln Gly Ile Thr Asn Gln Ala Thr Thr Arg  
 35 40 45

Ser Gln Thr Thr His Gln Ala Thr Ile Asp Gln Thr Thr Gln Ile  
 50 55 60

Pro Asn Leu Glu Thr Asp Glu Ala Lys Ala Asp Arg Phe Val Glu Glu  
 65 70 75 80

Tyr Asp Arg Thr Ala Gln Val Leu Leu Asn Glu Tyr Ala Glu Ala Asn  
 85 90 95

Trp Gln Tyr Asn Thr Asn Ile Thr Ile Glu Gly Ser Lys Ile Leu Leu  
 100 105 110

Glu Lys Ser Thr Glu Val Ser Asn His Thr Leu Lys Tyr Gly Thr Arg  
 115 120 125

Ala Lys Thr Phe Asp Val Ser Asn Phe Gln Asn Ser Ser Ile Lys Arg  
 130 135 140

Ile Ile Lys Lys Leu Gln Asn Leu Asp Arg Ala Val Leu Pro Pro Lys  
 145 150 155 160

Glu Leu Glu Glu Tyr Asn Gln Ile Leu Leu Asp Met Glu Thr Thr Tyr  
 165 170 175

Ser Leu Ser Asn Ile Cys Tyr Thr Asn Gln Thr Cys Met Pro Leu Glu  
 180 185 190

Pro Asp Leu Thr Asn Met Met Ala Thr Ser Arg Lys Tyr Glu Glu Leu  
195 200 205

Leu Trp Ala Trp Lys Ser Trp Arg Asp Lys Val Gly Arg Ala Ile Leu  
210 215 220

Pro Phe Phe Pro Lys Tyr Val Glu Phe Ser Asn Lys Ile Ala Lys Leu  
225 230 235 240

Asn Gly Tyr Thr Asp Ala Gly Asp Ser Trp Arg Ser Leu Tyr Glu Ser  
245 250 255

Asp Asn Leu Glu Gln Asp Leu Glu Lys Leu Tyr Gln Glu Leu Gln Pro  
260 265 270

Leu Tyr Leu Asn Leu His Ala Tyr Val Arg Arg Ser Leu His Arg His  
275 280 285

Tyr Gly Ser Glu Tyr Ile Asn Leu Asp Gly Pro Ile Pro Ala His Leu  
290 295 300

Leu Gly Asn Met Trp Ala Gln Thr Trp Ser Asn Ile Tyr Asp Leu Val  
305 310 315 320

Ala Pro Phe Pro Ser Ala Pro Asn Ile Asp Ala Thr Glu Ala Met Ile  
325 330 335

Lys Gln Gly Trp Thr Pro Arg Arg Ile Phe Lys Glu Ala Asp Asn Phe  
340 345 350

Phe Thr Ser Leu Gly Leu Leu Pro Val Pro Pro Glu Phe Trp Asn Lys  
355 360 365

Ser Met Leu Glu Lys Pro Thr Asp Gly Arg Glu Val Val Cys His Pro  
370 375 380

Ser Ala Trp Asp Phe Tyr Asn Gly Lys Asp Phe Arg Ile Lys Gln Cys  
385 390 395 400

Thr Ser Val Asn Met Glu Asp Leu Val Ile Ala His His Glu Met Gly  
405 410 415

His Ile Gln Tyr Phe Met Gln Tyr Lys Asp Leu Pro Val Thr Phe Arg  
420 425 430

Glu Gly Ala Asn Pro Gly Phe His Glu Ala Ile Gly Asp Ile Met Ala  
435 440 445

Leu Ser Val Ser Thr Pro Lys His Leu Tyr Ser Leu Asn Leu Leu Ser  
450 455 460

Thr Glu Gly Ser Gly Tyr Glu Tyr Asp Ile Asn Phe Leu Met Lys Met  
465 470 475 480

Ala Leu Asp Lys Ile Ala Phe Ile Pro Phe Ser Tyr Leu Ile Asp Gln  
485 490 495

Trp Arg Trp Arg Val Phe Asp Gly Ser Ile Thr Lys Glu Asn Tyr Asn  
500 505 510

Gln Glu Trp Trp Ser Leu Arg Leu Lys Tyr Gln Gly Leu Cys Pro Pro  
515 520 525

Val Pro Arg Ser Gln Gly Asp Phe Asp Pro Gly Ser Lys Phe His Val  
530 535 540

Pro Ala Asn Val Pro Tyr Val Arg Tyr Phe Val Ser Phe Ile Ile Gln  
545 550 555 560

Phe Gln Phe His Glu Ala Leu Cys Arg Ala Ala Gly His Thr Gly Pro  
565 570 575

Leu His Lys Cys Asp Ile Tyr Gln Ser Lys Glu Ala Gly Lys Leu Leu  
580 585 590

Ala Asp Ala Met Lys Leu Gly Tyr Ser Lys Pro Trp Pro Glu Ala Met  
595 600 605

Lys Leu Ile Thr Gly Gln Pro Asn Met Ser Ala Ser Ala Met Met Asn  
610 615 620

Tyr Phe Lys Pro Leu Thr Glu Trp Leu Val Thr Glu Asn Arg Arg His  
625 630 635 640

Gly Glu Thr Leu Gly Trp Pro Glu Tyr Asn Trp Ala Pro Asn Thr Ala  
645 650 655

Arg Ala Glu Gly Ser Thr Ala Glu Ser Asn Arg Val Asn Phe Leu Gly  
660 665 670

Leu Tyr Leu Glu Pro Gln Gln Ala Arg Val Gly Gln Trp Val Leu Leu  
675 680 685

Phe Leu Gly Val Ala Leu Leu Val Ala Thr Val Gly Leu Ala His Arg  
690 695 700

S/5

Leu Tyr Asn Ile Arg Asn His His Ser Leu Arg Arg Pro His Arg Gly  
705 710 715 720

Pro Gln Phe Gly Ser Glu Val Glu Leu Arg His Ser Leu Ala His Arg  
725 730 735

Leu Tyr Asn Ile Arg Asn His His Ser Leu Arg Arg Pro His Arg Gly  
740 745 750

Pro Gln Phe Gly Ser Glu Val Glu Leu Arg His Ser  
755 760